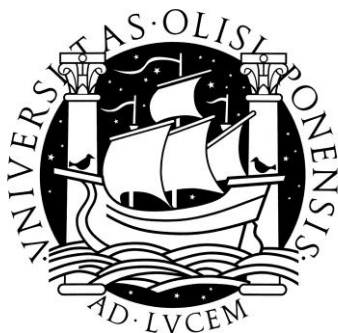


Universidade de Lisboa

*Faculdade de Farmácia*



Avaliação e modulação do potencial citotóxico do  
cádmio em células mamárias humanas

**Sandrina da Silva Gonçalves**

*MESTRADO EM CONTROLO DA QUALIDADE E TOXICOLOGIA DOS  
ALIMENTOS*

2011

Universidade de Lisboa

*Faculdade de Farmácia*



# Avaliação e modulação do potencial citotóxico do cádmio em células mamárias humanas

**Sandrina da Silva Gonçalves**

*MESTRADO EM CONTROLO DA QUALIDADE E TOXICOLOGIA DOS  
ALIMENTOS*

Orientador: Professora Doutora Matilde Castro

Co-orientador: Professor Doutor Nuno Oliveira

2011

## Agradecimentos

Em primeiro lugar quero agradecer à minha orientadora, a Professora Matilde Castro, por ter permitido a realização desta dissertação no seio do grupo *Chemical Biology and Toxicology* - CBT, iMed-UL, e ainda o seu apoio, carinho, encorajamento, visão e liderança, um muito obrigado.

Quero também agradecer ao meu co-orientador, o Professor Nuno Oliveira, pela sua compreensão, paciência, disponibilidade permanente, críticas, correcções e sugestões feitas ao longo da sua orientação. Um muito obrigado pelo seu apoio, ajuda e amizade. Foi um enorme prazer poder trabalhar com alguém de elevado rigor e experiência científica.

De forma muito especial, gostaria de mostrar o meu profundo agradecimento à Dra. Ana Sofia Fernandes por todo o apoio, paciência, compreensão, ajuda constante e amizade demonstrada ao longo do período desta tese. Obrigado pela sua sempre boa disposição e disponibilidade permanente.

De forma particular, gostaria também de agradecer à Dra. Joana Miranda, Dra. Judite Costa e Dra. Fátima Cabral por todo o apoio, disponibilidade e amizade.

E sem nunca esquecer, quero agradecer a todos os colegas de laboratório que me acompanharam durante este período. À Joana Marques, Madalena Cipriano, Elysse Filipe, Patrícia Guerreiro e em especial à Inês Magro, a qual partilhou comigo os dois anos de mestrado. Obrigado pelo vosso apoio, boa disposição, partilha de experiências e principalmente pela vossa amizade.

Neste laboratório encontrei um grupo de pessoas extraordinárias que transformaram este ano numa experiência que me conduziu, não só ao crescimento a nível profissional como também a nível pessoal.

Quero agradecer aos meus amigos, em especial ao Miguel de Carvalho, pelo apoio e amizade incondicional.

Um especial obrigado ao Hélder, por fazer esta caminhada ao meu lado, apoiando, motivando, encorajando e principalmente por acreditar sempre em mim. Obrigado pelo teu amor e carinho.

Finalmente, gostaria de agradecer à minha família, especialmente aos meus pais e irmã, por todo o apoio, encorajamento, orgulho e principalmente pelo vosso amor incondicional, durante esta minha caminhada académica. Obrigado por me fazerem acreditar que é sempre possível.

## Resumo

O cádmio (Cd) é um metal pesado, tóxico e muito utilizado a nível industrial, sendo considerado um poluente ambiental ao qual o Homem tem vindo a ser exposto através do tabaco e da sua actividade ocupacional. Os alimentos são também uma fonte importante de Cd, sendo considerada a principal fonte de exposição para a população não fumadora em geral. Este metal foi classificado como sendo um cancerígeno humano devido a evidências de aparecimento de tumores em diferentes órgãos, obtidas em modelos animais ou em populações humanas expostas. No que respeita ao tecido mamário, diversos efeitos celulares têm vindo a ser reportados ao Cd e alguns estudos epidemiológicos têm vindo a associar este elemento com o cancro de mama. O trabalho aqui apresentado inclui a avaliação da citotoxicidade do cádmio ( $\text{CdCl}_2$ ), usando diferentes ensaios de viabilidade celular, bem como a avaliação da geração de espécies reactivas de oxigénio em células MCF10A, uma linha celular mamária humana de origem não tumoral. Pretendeu-se ainda investigar a potencial mitigação dos efeitos citotóxicos do Cd utilizando um agente quelante, o macrociclo [15]pyN<sub>5</sub>, na forma de sal de cálcio. O Cd mostrou ser citotóxico para as células MCF10A, revelando perfis de citotoxicidade semelhantes em ambos os ensaios utilizados, o ensaio do MTT e o ensaio do Cristal Violeta (CV). Pela avaliação morfológica verificaram-se alterações celulares degenerativas marcadas, acompanhadas de uma clara redução no número de células, para concentrações compreendidas entre 75  $\mu\text{M}$  e 200  $\mu\text{M}$ . A geração de radical anião superóxido intracelular foi também observada de uma forma ligeira, mas com significado estatístico para concentrações de Cd  $\geq 100 \mu\text{M}$ . O sal de cálcio de [15]pyN<sub>5</sub> mostrou claramente reduzir a citotoxicidade induzida pelo Cd (50 e 75  $\mu\text{M}$ ) pelo método de MTT. O ensaio de CV e a avaliação da morfologia celular confirmaram estes resultados. Em resumo, no modelo experimental de células mamárias aqui apresentado, o Cd mostrou ser citotóxico, sendo em concentrações elevadas, um indutor de ROS. Os resultados mostram também que o macrociclo [15]pyN<sub>5</sub> é um agente quelante eficaz para minorar a toxicidade do Cd.

## Palavras-chave:

Cádmio, células MCF10A, citotoxicidade, macrociclo [15]pyN<sub>5</sub>, terapêutica por quelação

## Abstract

Cadmium (Cd) is a toxic heavy metal with many industrial uses and is considered an environmental pollutant to which humans have been exposed through tobacco and occupational activity. Food is also an important source of Cd being considered the main source of exposure for non-smoking general population. This metal was classified as a human carcinogen mainly due to the sufficient evidence for tumors in different organs, obtained either in experimental animals or in human populations exposed to cadmium compounds. In what concerns to the mammary tissue, different Cd-induced cellular effects have been reported and some epidemiological studies have associated Cd with breast cancer. The work reported here includes the evaluation of the cytotoxicity profiles of Cd using different mechanism-based cell viability assays as well as the assessment of the generation of reactive oxygen species (ROS), in human MCF10A cells. Importantly, this report provides experimental data on the mitigation of Cd cytotoxicity in MCF10A cells using a novel chelating agent, the macrocycle [15]pyN<sub>5</sub> in the form of calcium salt. Cadmium (CdCl<sub>2</sub>) revealed to be cytotoxic to MCF10A cells showing linear dose-response curves with similar patterns using the MTT and CV assays. The evaluation of cell morphology showed marked degenerative morphological changes, along with a clear reduction in cell number for the concentrations ranging from 75  $\mu$ M to 200  $\mu$ M. The generation of superoxide radical was mildly, but significantly, observed for higher Cd concentrations ( $\geq 100$   $\mu$ M). Different concentrations of the calcium salt of [15]pyN<sub>5</sub> were shown to be very effective in preventing Cd (50 and 75  $\mu$ M) toxic effects using the MTT assay. The CV assay and cellular morphology confirmed these results. Overall, in the experimental model presented here for mammary cells, cadmium was shown to be cytotoxic, and at high concentrations, an inducer of ROS. The results also suggest that the macrocycle [15]pyN<sub>5</sub> is an effective protective agent for Cd-induced cytotoxicity.

## Keywords:

Cadmium, MCF10A mammary cells, cytotoxicity, macrocycle [15]pyN<sub>5</sub>, chelation therapy

# Índice

Agradecimentos	iii
Resumo	v
Abstract	vi
Índice	vii
Lista de Figuras	x
Lista de Tabelas	xii
Lista de Abreviaturas	xiii
<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1. Cádmio: Propriedades químicas, usos e fontes	2
2. Fontes de exposição ao cádmio	4
3. O Cádmio no alimento: Implicações	6
3.1. Exposição pela dieta	6
3.2. Níveis nos alimentos	6
3.3. Níveis de exposição	9
4. Toxicocinética e toxicidade do cádmio	11
4.1. Toxicocinética	11
4.1.1. Absorção e distribuição	11
4.1.2. Metabolismo e excreção	13
4.2. Toxicidade: aguda e crónica	15
4.2.1. Toxicidade aguda	15
4.2.2. Toxicidade crónica	16
4.2.2.1. Efeitos renais	16
4.2.2.2. Efeitos hepáticos	17
4.2.2.3. Efeitos ósseos	17
4.2.2.4. Efeitos cardiovasculares	18
4.2.2.5. Efeitos neurológicos	18
4.2.2.6. Efeitos na reprodução	19
4.2.2.7. Efeitos na gravidez	19
4.2.2.8. Efeitos nas crianças	20
	vii

5.	Carcinogenicidade do cádmio: Generalidades	20
5.1.	Modo de acção: Celular e molecular	21
5.2.	Estudos epidemiológicos	23
6.	Glândula mamária como possível alvo para os efeitos deletérios induzidos pelo cádmio	26
7.	Terapêutica por quelação para o metal cádmio	29
	<b>OBJECTIVO</b>	31
	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	33
1.	Materiais	34
1.1.	Reagentes	34
1.2.	Linha celular	34
2.	Métodos	35
2.1.	Síntese do macrociclo [15]pyN <sub>5</sub> e os seus respectivos sais	35
2.2.	Curva de distribuição de espécies	36
2.3.	Cultura de células MCF10A	37
2.4.	Ensaio de Viabilidade Celular	37
2.4.1.	Ensaio de redução do MTT	38
2.4.1.1.	Determinação da viabilidade celular pelo ensaio de redução do MTT	39
2.4.2.	Ensaio de Cristal Violeta	40
2.4.2.1.	Determinação da viabilidade celular pelo ensaio de Cristal Violeta	40
2.5.	Avaliação da morfologia celular	41
2.6.	Determinação da formação de espécies reactivas de oxigénio	42
3.	Análise estatística	44
	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	45
1.	Células MCF10A como modelo experimental	46
2.	Avaliação da citotoxicidade do Cd(II) em células MCF10A	47
3.	Avaliação da geração de espécies reactivas de oxigénio (ROS)	49
4.	Efeitos do sal de cálcio de [15]pyN <sub>5</sub> na mitigação da citotoxicidade do Cd(II)	51
4.1.	Efeito do agente macrocíclico [15]pyN <sub>5</sub> na viabilidade celular de células MCF10A	53
4.2.	Efeito do sal de cálcio do [15]pyN <sub>5</sub> na citotoxicidade do Cd(II)	54
4.2.1.	Efeito da acção quelante e da presença de Ca <sup>2+</sup> na reversão observada	57



<b>CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS</b>	59
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	62

## Lista de Figuras

<b>Figura 1.</b> Mecanismos propostos para a cancerigénese do cádmio.	22
<b>Figura 2.</b> Macrociclo [15]pyN <sub>5</sub> .	36
<b>Figura 3.</b> Redução do MTT em células viáveis pelas enzimas mitocondriais resultando na formação de um <i>formazan</i> .	38
<b>Figura 4.</b> Estrutura molecular do corante Cristal Violeta.	40
<b>Figura 5.</b> Reacção do dihidroetídio com o anião superóxido originando o produto fluorescente, 2-hidroxi-etídio.	42
<b>Figura 6.</b> Reacção da dihidrorodamina 123 com ROS originando o produto fluorescente, rodamina 123.	43
<b>Figura 7.</b> Viabilidade celular de células MCF10A, tratadas com diferentes concentrações de CdCl <sub>2</sub> , avaliada pelo ensaio de MTT (A) e pelo ensaio de CV (B).	47
<b>Figura 8.</b> Morfologia das células MCF10A após tratamento com diferentes concentrações de CdCl <sub>2</sub> , por 24 horas.	48
<b>Figura 9.</b> Efeito do cádmio (CdCl <sub>2</sub> ) nos níveis intracelulares de ROS em células MCF10A, avaliado por oxidação de DHR123 (A) e DHE (B).	50
<b>Figura 10.</b> Curva de distribuição de espécies calculada pelo programa <i>HySS</i> para as soluções aquosas contendo Cd(II) e o sal de cálcio de [15]pyN <sub>5</sub> .	52
<b>Figura 11.</b> Viabilidade celular de células MCF10A tratadas com diferentes concentrações do sal de cálcio (A) e do ligando (B) de [15]pyN <sub>5</sub> , avaliada pelo ensaio de MTT.	53

<b>Figura 12.</b> Efeito do sal de cálcio de [15]pyN <sub>5</sub> na citotoxicidade induzida por CdCl <sub>2</sub> em células MCF10A, (24 h, ensaio de MTT).	54
<b>Figura 13.</b> Viabilidade celular das células MCF10A tratadas com diferentes concentrações do complexo Cd[15]pyN <sub>5</sub> , avaliado pelo ensaio de MTT.	55
<b>Figura 14.</b> Efeito do sal de cálcio de [15]pyN <sub>5</sub> na citotoxicidade induzida por 75 µM de CdCl <sub>2</sub> em células MCF10A (24 h, ensaio de Cristal Violeta).	56
<b>Figura 15.</b> Morfologia de células MCF10A após diferentes tratamentos por 24 horas.	56
<b>Figura 16.</b> Efeito do ligando [15]pyN <sub>5</sub> na citotoxicidade induzida por CdCl <sub>2</sub> em células MCF10A (24h, ensaio de MTT).	57
<b>Figura 17.</b> Efeito de Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> na citotoxicidade induzida por CdCl <sub>2</sub> em células MCF10A (24h, ensaio de MTT).	58

## Lista de Tabelas

<b>Tabela I.</b> Resumo das várias aplicações industriais do cádmio.	2
<b>Tabela II.</b> Níveis de cádmio em vários grupos de alimentos, reportados por 19 países europeus, referentes ao ano 2003 e 2007.	8
<b>Tabela III.</b> Exposição alimentar da população adulta ao cádmio ( $\mu\text{g/kg pc/semana}$ ), na Europa.	10
<b>Tabela IV.</b> Estudos epidemiológicos de avaliação do risco de cancro por exposição ao cádmio.	25
<b>Tabela V.</b> Estudos epidemiológicos de avaliação dos níveis de cádmio presentes em leite humano.	26

## Lista de Abreviaturas

[15]pyN<sub>5</sub> - 3,6,9,12,18-pentaazabicyclo[12.3.1]octadeca-1(18),14,16-triene

ASAE - Autoridade de Segurança Alimentar e Económica

ATSDR – *Agency for Toxic Substance and Disease Registry*

BER – Reparação por excisão de bases

Cd - Cádmio

CONTAM - *Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain*

CV - Cristal violeta

DHE - Dihidroetídio

DHR123 - Dihidrorodamina 123

DL<sub>50</sub> – Dose letal média

DM - Densidade mamográfica

DMEM/F12 - *Dulbecco's Modified Eagle Medium / nutrient mixture F-12 Ham*

DMSO - Dimetilsulfóxido

DNA - Ácido desoxirribonucleico

EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético

EFSA - *European Food Safety Authority*

EGF - Factor de crescimento epidérmico humano

EPA - *Environmental Protection Agency*

FAO - *Food and Agriculture Organization of the United Nations*

GSH - Glutathione

IARC - *International Agency for Research on Cancer*

IC<sub>50</sub> - Concentração que inibe a viabilidade celular em 50%

JECFA - *Joint Expert Committee on Food Additives*

MCF10A - Células epiteliais de tecido mamário humano não tumorais

MCF7 – Células de carcinoma mamário humano

MMR – *Mismatch Repair*

MT - Metalotioneína

MTT - Brometo tiazolil azul de tetrazólio

NADH - Nicotinamida Adenina Dinucleótido Reduzido

NADPH - Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato Reduzido

NER – Reparação por excisão de nucleótidos

NHANES - *The National Health and Nutritional Examination Survey*

NMR - Ressonância magnética nuclear

NTP – *National Toxicology Program*

OSHA - Organização Americana para a Segurança e a Saúde no Trabalho (*Occupational Safety and Health Administration*)

PBS – Tampão fosfato salino

pc - Peso corporal

PTWI - *Provisional Tolerable Weekly Intake* (Ingestão Semanal Tolerável Provisória)

QFA - Questionário de frequência alimentar

ROS - Espécies reactivas de oxigénio

SOD - Superóxido dismutase

TBHP - *Tert*-butilhidroperóxido

TWA - PEL - *Time weighted average permissible exposure limit* (Tempo médio ponderado de limite de exposição permitido)

TWI -*Tolerable Weekly Intake* (Ingestão Semanal Tolerável)

UFR - Unidades de fluorescência relativa

WHO - *World Health Organization* (Organização Mundial de Saúde (OMS))

# INTRODUÇÃO



## 1. Cádmio: Propriedades químicas, usos e fontes

O cádmio (Cd) é um metal não essencial, pertencente ao grupo 2 da tabela periódica, com um estado de oxidação de +2, quimicamente semelhante ao zinco, muito resistente à corrosão, estável, inodoro, maleável, macio, flexível e que no seu estado puro pode assumir a forma de metal (cor branca-prateada) ou pó (cor branca-acizentada). Usualmente, é encontrado sob a forma de ião metálico bivalente [NTP, 2011].

Este metal foi descoberto no ano de 1817, iniciando-se a sua comercialização no final do século XIX. Começou por ser usado em pigmentos para tintas, na forma de sulfito e também em amálgamas dentárias, nos inícios do ano 1900. Durante a Segunda Guerra Mundial, foi utilizado como substituto do estanho [NTP, 2011]. De facto, o Cd tem vindo ao longo das décadas a ser utilizado no fabrico de diversos tipos de materiais. Contudo, este elemento químico não se encontra no meio ambiente no seu estado puro, mas sim como um metal combinado com outros elementos como o oxigénio (óxido de cádmio), o cloro (cloreto de cádmio) ou o enxofre (sulfato e sulfito de cádmio). Estes compostos apresentam-se na forma sólida, têm diferentes solubilidades em água, grande resistência a produtos químicos e temperaturas elevadas. O Cd é pouco utilizado no seu estado puro, embora possua propriedades como baixo ponto de fusão e resistência à corrosão. No entanto, os seus compostos são utilizados em variados produtos, como se pode verificar na Tabela I [Fernandes *et al.*, 2007a].

**Tabela I.** Resumo das várias aplicações industriais do cádmio. Adaptado de Fernandes *et al.* (2007a).

Produto	Utilização	% Relativamente ao total dos produtos de cádmio
Baterias de cádmio- níquel	Hidróxido de cádmio utilizado como eléctrodo	83%
Revestimentos anti-corrosão	Revestimentos com Cd em ferro, aço, alumínio e outros metais não ferrosos	7%
Pigmentos	Sulfitos, entre outros, usados em plásticos, cerâmica, vidro, esmalte e tintas	8%
Estabilizadores de plásticos e produtos sintéticos	Sais orgânicos de Cd incorporados no PVC (cloreto de polivinilo)	1,2%
Outros	Ligas de condutividade, células solares e aplicações electrónicas	0,8%

Como mostra a Tabela I, o uso principal de Cd é a produção de baterias níquel-cádmio (83% do total do uso de Cd). Além disso, existem produtos nos quais o Cd se encontra como impureza, tais como metais não ferrosos, amálgamas de zinco, chumbo e níquel, ferro e aço, combustíveis fósseis (carvão, petróleo, gás, madeira e turfa), cimentos e fertilizantes fosfatados. Desde os anos 80 que o uso de Cd em baterias tem vindo a aumentar acentuadamente, ao contrário do que acontece com outras aplicações, as quais têm vindo a diminuir desde 1990 [ATSDR, 2008; NTP, 2011].

A actividade humana, nos últimos dois séculos, tem levado ao aumento das emissões de Cd na atmosfera, as quais têm vindo a ser bastante superiores às oriundas de fontes geogénicas [EFSA, 2009]. O Cd surge na crosta terrestre (0,1-0,5 ppm) em rochas e solos, em consequência de actividades naturais, erupções vulcânicas, erosão e abrasão de rochas, incêndios florestais e ainda associado a minerais, sobretudo em minérios de zinco, mas também de chumbo e cobre. Na água dos oceanos, os níveis naturais de Cd rondam 0,1 µg/L [ATSDR, 2008]. No caso das fontes antropogénicas, o Cd pode ser libertado por emissões de indústrias de fundição e refinação de metais não-ferrosos, combustão de combustíveis fósseis, indústrias mineiras, incineração de resíduos domésticos e municipais, esgotos e ainda a partir do fabrico e aplicação de fertilizantes agrícolas e deposição de resíduos nos solos [FAO/WHO, 2011].

No ambiente, o Cd subsiste no ar, água e solo, circulando entre eles, não se degradando e podendo variar entre diferentes formas químicas, a maioria das quais podem permanecer no ambiente por longos períodos de tempo. As partículas atmosféricas contendo Cd podem viajar longas distâncias e por deposição gravitacional, ou após dissolução na humidade atmosférica, acumular-se nos solos e águas sob a forma de poeiras, chuva ou neve. Um composto de Cd(II) que entre nos cursos de água pode permanecer nos mesmos por um longo período ou então deslocar-se para o solo. A mobilidade do Cd nos solos depende de vários factores como o pH, conteúdo em matéria orgânica e a sua presença torna-o disponível para as plantas, outros organismos vivos e também para os sistemas aquíferos [ATSDR, 2008].

## 2. Fontes de exposição ao cádmio

Em meados das décadas de 30 e 40, surgiram os primeiros estudos de exposição ocupacional ao Cd reportando lesões pulmonares e renais em trabalhadores industriais, sendo desde então reconhecida a possibilidade de este metal poder causar efeitos agudos e crónicos no Homem. Já no início do séc. XIX se tinha descoberto a capacidade de o Cd poder provocar toxicidade aguda. Porém, foi o caso da doença óssea endémica de nome *Itai-itai*, ocorrida no Japão, que chamou a atenção do mundo para a dimensão do perigo deste poluente para o ambiente [Bernard, 2008]. A doença *Itai-itai*, caracterizada por fracturas ósseas e dores intensas, proteinúria, osteomalácia severa e osteoporose, disfunção renal, deficiências imunitárias, anemias e deformações a nível do esqueleto, surgiu principalmente entre mulheres, tendo sido causada pela ingestão de arroz e água contaminada com Cd, por um período de 30 anos [Inaba *et al.*, 2005; Pan *et al.*, 2010]. A contaminação teve origem em minas de zinco, localizadas nas montanhas, onde o Cd era rejeitado como impureza directamente para os rios [Inaba *et al.*, 2005]. Estudos realizados nas populações afectadas demonstraram uma relação dose-resposta entre a presença de Cd na urina e a taxa de mortalidade entre os indivíduos expostos, sendo que o conteúdo em Cd no esqueleto de indivíduos afectados era superior em comparação a indivíduos não expostos [Jarup, 2002].

Nos últimos 50 anos, a consciencialização e a preocupação acerca da toxicidade exercida pelo Cd resultou numa vasta literatura sobre este tema, na medida em que a comunidade científica tem vindo a realizar inúmeros estudos epidemiológicos e experimentais com o intuito de caracterizar os mecanismos de toxicidade exercida pelo Cd e determinar os níveis de exposição a partir dos quais este poluente pode ameaçar a saúde humana [Bernard, 2008].

Sobre a exposição humana ao Cd sabe-se que esta ocorre geralmente através da via oral (ver Secção 3), inalatória e por contacto dérmico. Na contaminação por contacto, pequenas quantidades de Cd podem ser absorvidas pela pele, mas a fracção absorvida é pouco significativa para a exposição total. Desta forma, para a população em geral, as principais vias de exposição ao Cd são a via gastrointestinal, por ingestão de alimentos e água contaminados e a via inalatória, por inalação de partículas provenientes do fumo do cigarro e do ar que se respira. No caso da população não fumadora, os alimentos constituem cerca de 90% do total de exposição enquanto 10% estão associados aos baixos níveis de Cd no ar respirável e à ingestão de água contaminada [Jarup *et al.*, 1998; EFSA, 2009]. No que respeita à população

fumadora, a principal fonte de exposição é a inalação do fumo de cigarro. As folhas da planta do tabaco acumulam de forma natural grandes quantidades de Cd. Um cigarro pode conter cerca de 1-2 µg Cd (variando conforme o tipo e marca). Aproximadamente 10% do conteúdo em Cd de um cigarro é inalado, com 50% de absorção nos pulmões. Estima-se que uma pessoa que fume 20 cigarros por dia irá absorver cerca de 1 µg de Cd/dia [Wagner e Yeargan, 1986; Jarup e Akesson, 2009]. Relativamente aos fumadores passivos, nomeadamente adultos, o fumo do cigarro ambiental não parece ser uma fonte de exposição ao Cd. Contudo, tem surgido alguma evidência deste tipo de exposição em crianças [Jarup e Akesson, 2009].

Retomando o tema da inalação de ar poluído por parte da população em geral, para além da exposição ocupacional, a população encontra-se exposta também à contaminação ambiental. Populações que habitam perto de zonas de poluição com Cd podem inalar diariamente entre 1 a 75 µg de Cd, o que pode ter um grande significado para os efeitos tóxicos mediados por este metal [Fernandes *et al.*, 2007a]. Estudos realizados em áreas com solos contaminados têm associado a poeira doméstica como uma potencial fonte de exposição ambiental ao Cd [Hogervorst *et al.*, 2007]. A concentração de Cd no ar respirável varia, geralmente, entre 0,5 a 5 ng/m<sup>3</sup> em áreas rurais e entre 15 a 150 ng/m<sup>3</sup> em áreas industrializadas. Em relação à exposição ocupacional ao Cd, esta ocorre em indústrias que utilizam este metal ou seus compostos e onde são desenvolvidas actividades relacionadas com produção de baterias, ligas metálicas, plásticos, fundições, refinarias de chumbo e zinco, produção e/ou uso de pigmentos [Huff *et al.*, 2007]. As actividades mineiras como as fábricas de processamento de folhas do tabaco são também locais de exposição ocupacional ao Cd, onde os trabalhadores estão sujeitos a níveis de exposição superiores comparativamente à população em geral [Fernandes *et al.*, 2007a]. A contaminação por contacto pode também ocorrer nestes locais. Todavia, este tipo de exposição tem vindo a decrescer nas duas últimas décadas devido a uma maior consciencialização por parte das diferentes indústrias [Huff *et al.*, 2007]. A Organização Americana para a Segurança e a Saúde no Trabalho, *Occupational Safety and Health Administration* – OSHA, estabeleceu o limite de exposição permitido, *time weighted average permissible exposure limit* - TWA – PEL, como 5 µg/m<sup>3</sup> para exposição ocupacional de oito horas diárias para a totalidade dos compostos de Cd, incluindo poeiras e fumos [ATSDR, 2008].

### **3. O Cádmio no alimento: Implicações**

#### **3.1. Exposição pela dieta**

A entrada de Cd no organismo humano acontece, principalmente, como consequência da contaminação dos solos agrícolas [Jarup *et al.*, 1998]. Ao contrário de outros metais pesados, o Cd é eficazmente captado por plantas através do seu sistema radicular sendo este processo facilitado pela contínua acidificação do ambiente [Oskarsson *et al.*, 2004; Pan *et al.*, 2010]. De facto, as plantas possuem capacidade de absorver, acumular e tolerar metais pesados sendo essa aptidão diferente conforme espécie e variedade da planta. É de salientar, que nem todas as partes da planta são capazes de acumular Cd do mesmo modo, sendo as folhas a zona de maior concentração. Factores como o pH, matéria orgânica e concentração de Cd no solo conduzem a diferentes níveis de Cd nas plantações agrícolas. Além disso, o Cd é ainda capaz de se acumular em mamíferos e aves, nomeadamente nos tecidos gordos de animais que frequentam zonas de pasto contaminadas [Figueroa, 2008; EFSA, 2009; Pan *et al.*, 2010].

A exposição alimentar ao Cd pode ocorrer também durante os processos de manufactura de géneros alimentícios em que os materiais usados na produção, armazenamento, distribuição, venda e preparação culinária podem, em determinadas condições, libertar pequenas quantidades de Cd para o alimento no período de tempo de contacto entre ambos [Poças e Hogg, 2007]. A contaminação a partir da água de consumo humano é menos importante comparativamente aos alimentos. Contudo, impurezas presentes em tubagens residenciais de zinco galvanizadas, aquecedores e refrigeradores de água, torneiras, entre outros, podem levar, ocasionalmente, a aumentos nos níveis de Cd na água de consumo e assim constituir perigo para a saúde humana [WHO/FAO, 2007].

#### **3.2. Níveis nos alimentos**

Os alimentos que exibem maiores níveis de Cd são as vísceras animais, como o fígado e rins, espécies de moluscos e crustáceos, como as ostras e outros bivalves moluscos, cefalópodes e caranguejos [Jarup e Akesson, 2009; WHO, 2010]. De facto, concentrações elevadas de Cd verificam-se em organismos aquáticos como o caranguejo, sapateira e

bivalves, os quais conseguem bioconcentrar elevadas quantidades de Cd existentes no meio aquático. A captação deste metal pode ocorrer directamente da água ou indirectamente através da ingestão de organismos já contaminados. Sabe-se que os factores de bioconcentração para os peixes variam de 33 a 2210 [EPA, 1999; Fernandes *et al.*, 2007a]. Comparativamente, outros alimentos como os vegetais, cereais e raízes tendem a acumular pequenas quantidades de Cd [Pan *et al.*, 2010]. Porém, devido a um maior consumo destes géneros alimentares, estes representam a maior parte da ingestão diária de Cd na maioria das populações [Jarup e Akesson, 2009; WHO, 2010].

Os últimos dados obtidos do teor de Cd nos alimentos, reportados por dezanove países Europeus (Áustria, Bélgica, Bulgária, Chipre, Estónia, França, Alemanha, Grécia, Islândia, Irlanda, Itália, Holanda, Polónia, Roménia, Eslováquia, Eslovénia, Espanha, Suécia e Reino Unido), referentes aos anos de 2003 e 2007 e compilados pela *European Food Safety Authority* (EFSA), são apresentados na Tabela II [FAO/WHO, 2011].

Dos resultados reportados e compilados na Tabela II, os níveis médios de Cd mais elevados foram observados em vísceras de animais (0,206 mg/kg) e em mariscos e frutos do mar (0,215 mg/kg). Outras categorias alimentares que apresentaram valores médios de Cd altos corresponderam ao café, chá e cacau, especiarias, vegetais, nozes e leguminosas. Por outro lado, valores mínimos foram encontrados na carne, ovos, leite e seus derivados, frutas e sumos de frutas, água de torneira e engarrafada e bebidas alcoólicas [EFSA, 2009; FAO/WHO, 2011].

Em Portugal, alguns estudos foram realizados com o objectivo de determinar o teor em Cd, em diferentes espécies de pescado e mariscos de maior consumo [ASAE, 2009]. Um estudo realizado por Afonso *et al.* (2007) mostrou, que de acordo com os níveis permitidos pela WHO/FAO, o peixe-espada preto (*Aphano pascarbo*) capturado na Madeira e Açores não representa risco para a saúde pública em termos de contaminação com Cd. Outro estudo, desta vez realizado pela ASAE, através do Plano Nacional de Colheita de Amostras, caracterizou as concentrações de mercúrio (Hg), Cd e chumbo (Pb) em algumas espécies de peixes, cefalópodes e crustáceos que se encontravam à venda no retalho no final de 2007. Relativamente ao Cd, constatou-se que o limite definido no Regulamento CE nº (CE) 1881/2006 de 0,5 mg/kg, foi apenas ultrapassado numa amostra de sapateira (6,10 mg/kg). Em Portugal, não existem outras referências a teores elevados de Cd em sapateira. Porém, é importante referir a falta de dados actualizados de ingestão de pescado e especialmente de mariscos, os quais são determinantes para avaliar os riscos da exposição ao Cd por estes

alimentos, permitindo conhecer a contribuição real destes alimentos para a exposição a este metal [ASAE, 2009].

**Tabela II.** Níveis de cádmio em vários grupos de alimentos, reportados por 19 países europeus, referentes ao ano 2003 e 2007. Adaptado de FAO/WHO (2011).

<b>Categoria alimentar</b>	<b>Nº de amostras</b>	<b>Nº de não dectados</b>	<b>Concentração média (mg/kg)</b>	<b>Concentração máxima (mg/kg)</b>
Cereais	12179	1705	0,023	0,220
Raízes ricas em amido ou batatas	2135	320	0,021	0,142
Vegetais, nozes e leguminosas	16335	3430	0,067	2,709
Frutos	4300	2408	0,004	0,050
Sumos de fruta & vegetais, refrigerantes de frutas (excluindo água engarrafada)	2920	1531	0,003	0,090
Carne e produtos de carne e substitutos (incluindo aves)	20142	11280	0,017	8,746
Vísceras comestíveis e produtos de vísceras (carnes e aves)	16049	1765	0,206	34,50
Ovos	667	320	0,003	0,018
Mariscos e frutos do mar (derivados)	5780	1040	0,215	4,525
Peixes e derivados	10172	4781	0,023	0,660
Leite e produtos lácteos	7305	3433	0,005	0,097
Gorduras (vegetal + animal)	1064	149	0,006	0,104
Café, chá e cacau	2115	254	0,074	2,075
Açúcar e produtos de açúcar, incluindo o chocolate	3810	1410	0,031	0,470
Especiarias	1336	214	0,062	0,612
Bebidas alcoólicas	3410	1944	0,002	0,250
Água da Torneira	19000	6460	0,0004	0,010
Água engarrafada	2448	1689	0,0004	0,0030
<b>Número total</b>	<b>131167</b>	<b>44133</b>	-	-

### 3.3. Níveis de exposição

Uma vez que o Cd está presente na maioria dos alimentos, em concentrações variáveis (Tabela II, Secção 3.2.), os níveis de ingestão dependem não só das condições sob as quais os alimentos são produzidos mas também dos diferentes hábitos alimentares que as populações possuem.

A literatura existente reporta que o consumo médio diário de Cd por adultos, em áreas não poluídas se encontra entre 8 e 25 µg/dia, podendo ser centenas de vezes superior em áreas poluídas [Bernard, 2008; Jarup e Akesson, 2009; Pan *et al.*, 2010]. Um estudo realizado nas Ilhas Canárias, Espanha, identificou o peixe como a maior fonte de exposição de Cd através da dieta para a população em geral, constituindo cerca de 36 % da ingestão total. Alimentos como as frutas, vegetais e cereais foram também fontes importantes. A ingestão total de Cd nestas ilhas foi estimada em cerca de 11,165 µg/dia para um pc de 70 kg [Rubio *et al.*, 2006].

Nos países europeus, estimou-se um consumo médio de Cd entre 1,9 a 3,0 µg/kg pc por semana. No entanto, em indivíduos altamente expostos, o consumo de Cd variou entre 2,5 a 3,9 µg/kg pc por semana. Em ambos os casos, os valores mostraram estar próximos e ligeiramente acima do TWI, Ingestão Semanal Tolerável, de 2,5 µg/kg pc estabelecido. Estes valores encontram-se na Tabela III, presente no relatório da EFSA, referente ao período entre 2003 a 2007 [EFSA, 2009].

Um estudo realizado na Bélgica estimou a exposição ao Cd pela dieta em habitantes de uma zona contaminada próxima de indústrias de produção de metais não-ferrosos e comparou os resultados obtidos com a população adulta em geral. Os habitantes da área contaminada apresentaram maiores níveis de ingestão de Cd em comparação com a população geral. A ingestão média por dia estimada foi de 31,3 µg/dia para os residentes na zona contaminada, em comparação com 17,0 µg/dia para a população em geral. A análise de alimentos mostrou níveis de Cd em carnes, vísceras, frutas, vegetais e batatas de duas a nove vezes superior, comparativamente aos alimentos recolhidos nas zonas não contaminadas [Vromman *et al.*, 2008].



**Tabela III.** Exposição alimentar da população adulta ao cádmio ( $\mu\text{g/kg pc/semana}$ ), na Europa. Adaptado de EFSA (2009).

País	Exposição ( $\mu\text{g/kg pc/semana}$ ) <sup>a)</sup>	
	Média	Alta
Bélgica	2,33	3,28
Bulgária	1,89	3,13
República Checa	2,37	3,08
Dinamarca	2,26	2,79
Finlândia	1,95	2,54
França	2,27	3,13
Alemanha	2,96	3,58
Hungria	2,16	2,72
Islândia	2,08	3,10
Irlanda	2,54	3,46
Itália	2,05	2,68
Holanda	2,25	2,95
Noruega	2,31	2,82
Eslováquia	2,29	3,91
Suécia	2,32	2,91
Reino Unido	2,15	2,88
<b>(mediana UE)</b>	<b>2,27</b>	<b>3,02</b>

<sup>a)</sup> Peso corporal padrão usado na estimativa – 60 kg.

Embora os dados disponíveis na literatura indiquem que a maioria da população possui níveis de ingestão de Cd abaixo do PTWI, Ingestão Semanal Tolerável Provisória, vários organismos internacionais reconheceram que a margem entre esse valor e a real ingestão semanal de Cd pela população em geral é pequena e muitas vezes inexistente. Um valor de PTWI de 7  $\mu\text{g/kg pc/semana}$  foi estabelecido pelo *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives* (JEFCA) e aprovado pelo Comité Científico para a Alimentação Humana, para um peso corporal de 60 kg. Este valor foi baseado na prevalência de disfunção tubular renal, um biomarcador de efeito tóxico e foi estabelecido de modo a que a concentração de Cd no córtex renal não exceda 50  $\mu\text{g/g}$  após 50 anos de exposição. Já o CONTAM, *Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain*, estabeleceu um TWI de 2,5  $\mu\text{g/kg pc}$ , tendo como base uma meta-análise para avaliação da relação dose-resposta entre a presença de Cd na urina e o biomarcador urinário  $\beta$ -2-microglobulina [EFSA, 2009].

## 4. Toxicocinética e toxicidade do cádmio

### 4.1. Toxicocinética

#### 4.1.1. Absorção e distribuição

A quantidade de Cd absorvida pelo organismo humano após exposição varia conforme a via de entrada, podendo ser efectuada através do sistema dérmico, pulmonar e gastrointestinal [Joseph, 2009]. Sobre a absorção por via dérmica pouco se sabe, apenas que é extremamente baixa, havendo referência na literatura a dois mecanismos que facilitam a absorção pela pele. Um deles, envolve a ligação de ião Cd(II) a radicais sulfidrilo de cisteínas presentes na queratina epidérmica enquanto o outro envolve a complexação com metalotioneínas [Godt *et al.*, 2006].

Na exposição por inalação, a absorção de Cd pelos pulmões é variável, dependendo da solubilidade e tamanho das partículas inaladas. Partículas de grande dimensão tendem a ficar depositadas nas vias aéreas superiores, enquanto outras de pequena dimensão penetram nos alvéolos pulmonares sendo este o principal local de absorção de Cd. Sabe-se que aproximadamente 3-10% do Cd ingerido é absorvido pelo sistema gastrointestinal enquanto 50% de Cd inalado é absorvido pelos pulmões [Joseph, 2009].

Relativamente ao sistema gastrointestinal, experiências *in vivo* mostraram que a absorção de Cd em ratinhos pode ser ainda mais baixa comparativamente ao Homem. A absorção gastrointestinal de Cd em humanos é geralmente baixa, tendo sido comprovada com estudos baseados na retenção deste elemento em organismos humanos após ingestão de Cd radioactivo [ATSDR, 2008]. A absorção intestinal a partir do epitélio intestinal parece acontecer em duas fases: absorção a partir do lúmen para a mucosa (fase rápida) e transferência para a circulação, envolvendo proteínas transportadoras, canais de iões de cálcio, aminoácidos transportadores e por endocitose de complexos cádmio-metalotioneínas (Cd-MT) (fase lenta) [Zalups e Ahmad, 2003; ATSDR, 2008; Sabolic *et al.*, 2010].

Estudos tanto em animais (ratinhos e ratos) como em humanos reconheceram que a absorção intestinal de Cd pode ser influenciada por um vasto número de factores. De facto, factores fisiológicos como a idade, *status* de bioelementos (*e.g.* zinco, ferro, cálcio), gravidez e composição da dieta podem variar a quantidade de Cd absorvida [Brzoska e Moniuszko-Jakoniuk, 2001; ATSDR, 2008; FAO/WHO, 2011]. A existência de deficiências em bioelementos como o cálcio e ferro, por exemplo, originam a potenciação da absorção de Cd

via intestinal em animais como em humanos adultos [Olsson *et al.*, 2002; Andersen *et al.*, 2004; Kippler *et al.*, 2009]. Este facto apoia a ideia de que a toxicidade exercida pelo Cd a nível molecular envolve interações com as vias de transporte de metais essenciais [Thevenod, 2010]. Experiências *in vitro* apuraram que transportadores regulados pelo *status* do ferro possuem afinidade para o Cd, podendo assim a absorção intestinal de Cd ser potenciada pela elevada expressão desses transportadores no intestino delgado numa situação de deficiência de ferro [Moulis e Thevenod, 2010]. Estudos epidemiológicos reportaram uma maior absorção de Cd em indivíduos com baixas concentrações de ferritina, principalmente mulheres, com uma média de absorção de 8,9 % face à média de 2,3 %, em indivíduos com concentrações de ferritina elevadas [EFSA, 2009].

Após absorção pelos sistemas pulmonares e gastrointestinais, assume-se que o Cd é rapidamente transportado pelo sistema sanguíneo, primariamente ligado à albumina e outras macromoléculas reactivas contendo grupos tiol até aos diversos órgãos do organismo humano onde se estima que o seu tempo de semi-vida seja de 20 a 30 anos [Klaassen, 2008; Joseph, 2009; Sabolic *et al.*, 2010]. O Cd é distribuído por todo o organismo, sendo a maior porção distribuída pelo fígado e rins. Em casos de exposição crónica a níveis de Cd reduzidos, o Cd acumula-se maioritariamente nos rins, enquanto numa exposição aguda o nível de Cd nestes dois órgãos aproxima-se. A quantidade de Cd armazenada nos órgãos varia de forma considerável sendo que aproximadamente 50% do Cd encontrado no organismo é armazenado no fígado e rins (órgãos que apresentam maiores níveis de MTs). Contudo, órgãos como os testículos, baço, coração, timo, glândulas salivares, epidídimo e próstata conseguem também acumular este metal pesado mas em menores quantidades [Klaassen *et al.*, 2009; Joseph, 2009].

Vários estudos, incluindo mulheres fumadoras e não fumadoras, demonstraram que a exposição materna ao Cd provoca a acumulação deste metal pesado na placenta e consequentemente no sangue do cordão umbilical [Kippler *et al.*, 2009; Kippler *et al.*, 2010]. Alguns estudos referem ainda uma possível acumulação na glândula mamária e consequentemente a presença no leite materno [Nishijo *et al.*, 2002; Garcia-Esquinas *et al.*, 2011; Ohrvik *et al.*, 2011]. Na Secção 6, este assunto será abordado em maior profundidade.

#### 4.1.2. Metabolismo e excreção

Em sistemas biológicos, o Cd encontra-se sob a forma de catião divalente possuindo capacidade de conjugação com grupos aniônicos, especialmente sulfidrilos em proteínas (albumina e metalotioneínas (MTs)) e outras macromoléculas [Moulis, 2010]. As MTs são proteínas ricas em cisteínas de baixo peso molecular, que estão envolvidas na ligação e destoxificação de níveis excessivos de Cd e outros metais, como o zinco e o cobre [Klaassen *et al.*, 1999; Klaassen *et al.*, 2009]. Quatro principais isoformas de MTs foram identificadas, MT1-MT4. As formas MT1 e MT2 são as induzidas após exposição ao Cd e altamente expressas no intestino, fígado, rins e pâncreas [Ohrvik, 2010].

Como foi referido na Secção 4.1.1, o Cd parece ser transportado na corrente sanguínea pela albumina sendo retido no fígado e rins. Após recolha pelo fígado, o complexo Cd-albumina é dissociado sendo o Cd(II) excretado pela biliar, principalmente ligado à glutathione (GSH) ou libertado no plasma sob a forma de complexo Cd-MT [Nordberg, 2009; EFSA, 2009]. No caso de excreção biliar total e da proporção ligada à glutathione (GSH), estas diminuem na exposição a longo prazo quando uma grande parte de Cd(II) no fígado se liga às MTs [Nordberg, 2009]. Estudos em animais de experiência demonstraram que em 24 horas de exposição, após uma única dose de CdCl<sub>2</sub>, houve um aumento proporcional de Cd(II) no fígado onde eventualmente ocorre ligação às MTs no tecido hepático. O mecanismo de transporte entre o fígado e os rins foi demonstrado pela transplantação de fígados de animais expostos ao Cd para animais não expostos, comprovando a existência de um transporte selectivo deste metal do fígado e captação do mesmo, nos rins dos animais transplantados. [Nordberg, 2009; EFSA, 2009].

Após formação dos complexos Cd-MT no fígado, estes são transferidos para os rins onde são filtrados pelos glomérulos renais e reabsorvidos nos túbulos proximais por endocitose adsorptiva mediada por transportadores específicos na superfície apical das células tubulares renais [Nordberg, 2009]. Desta forma, o complexo Cd-MT entra nos lisossomas das células tubulares onde o Cd (II) é libertado das MTs. Na exposição a longo prazo, o Cd(II) estimula a produção de novas MTs nas células tubulares renais as quais sequestram o Cd(II) no citosol, reduzindo o nível deste elemento no meio e evitando lesões nas células [Nordberg, 2009; EFSA, 2009]. A importância da MT para a toxicidade exercida pelo Cd foi comprovada em ratinhos MT nulos, *MT-null*, que são muito sensíveis aos danos causados pelo Cd nos rins [Klaassen *et al.*, 1999].

O antioxidante GSH desempenha um papel essencial na defesa da célula contra o stress oxidativo e na destoxificação de xenobióticos. Algumas experiências evidenciaram que na exposição aguda ao Cd ocorre uma rápida redução nos níveis de GSH devido à formação de complexos cádmio-glutationa (Cd-GSH), acreditando-se que esta é a primeira protecção contra Cd livre no citosol [Liu *et al.*, 2009; Ohrvik *et al.*, 2010]. A exposição crónica ao metal, em ratos, mostrou resultar muitas vezes em níveis elevados de GSH nos tecidos, numa tentativa de redução dos danos oxidativos provocados pelo Cd. A exposição de ratinhos MT nulos ao Cd apresentou uma forte resposta sob forma de espécies reactivas de oxigénio (ROS) relacionadas com a expressão de genes comparativamente a ratinhos *wild-type* suportando a hipótese de que a MT e GSH desempenham papéis complementares na protecção celular contra a toxicidade do Cd. Este metal parece afectar também enzimas como o complexo citocromo-c oxidase, a catalase e superóxido dismutase (SOD) [Cannino *et al.*, 2009; Joseph, 2009].

Relativamente à excreção do Cd absorvido, esta acontece maioritariamente por via urinária. Este processo é insuficiente e lento, contribuindo para o longo tempo de semi-vida deste metal no organismo e a possível ocorrência de efeitos tóxicos mesmo após redução parcial ou total da exposição [ATSDR, 2008; ASAE, 2009]. A parte de Cd não absorvida é eliminada via fecal. Contudo, uma fracção de Cd absorvida pode ser também excretada pelas fezes após secreção hepática de conjugados de Cd (*e.g.* glutatona) na bÍlis [ATSDR, 2008].

A excreção de Cd pode ocorrer também através dos cabelos e leite materno [Honda *et al.*, 2003; Menke *et al.*, 2009; Gil *et al.*, 2011; Kim e Kim, 2011], mas em menores quantidades.

A biotransformação de Cd, quer em animais quer em humanos, permanece ainda uma incógnita em diversos aspectos, não se sabendo se existe uma conversão metabólica directa como a oxidação, redução ou alquilação [Ohrvik, 2010].

## 4.2. Toxicidade: aguda e crónica

A forma de Cd, duração e via de exposição são variáveis que podem afectar a absorção e distribuição deste metal pesado pelos vários órgãos e tecidos alvos, como também a concentração no local-alvo e a severidade do efeito observado [Fernandes *et al.*, 2007a].

### 4.2.1. Toxicidade aguda

Estudos em animais, nomeadamente roedores, mostraram que a dose oral de Cd letal para 50% (DL<sub>50</sub>) de animais experimentais varia aproximadamente entre os 100 e 300 mg/kg pc, sendo dependente da forma de Cd administrada [FAO/WHO, 2011]. Em humanos, existem estudos que registaram casos de morte por via oral, a partir de doses acima de 1500 mg [Andujar *et al.*, 2010].

Para o Homem, a exposição aguda ao Cd pode ocorrer através da ingestão de compostos inorgânicos de Cd ou por inalação na forma de poeiras e fumos resultantes da combustão de materiais contendo este metal. O primeiro sintoma de uma intoxicação com Cd é o aparecimento de uma irritação no local de absorção, a qual surge poucas horas após a exposição [ATSDR, 2008]. No caso de uma intoxicação oral, os sintomas resumem-se a náuseas fortes, vómitos e diarreia, salivação excessiva e contracções abdominais. Com uma intoxicação grave, pode-se verificar falência renal aguda, seguida de depressão cardiopulmonar e consequentemente morte em 7-14 dias, como também acidose metabólica aguda e morte em 24 horas [Fernandes *et al.*, 2007a].

No caso de intoxicação por via inalatória, os sintomas apresentados são dores de garganta e abdominais, febre, asfixia, vómitos, dores nas pernas, falência renal e edema pulmonar agudo [Johri *et al.*, 2010; Andujar *et al.*, 2010]. A Organização Mundial de Saúde (OMS) declarou que o limiar para os efeitos respiratórios resultantes de uma exposição de 8 horas é de 0,5 mg/m<sup>3</sup>, sendo que exposições acima deste valor são consideradas perigosas para o Homem. A exposição a doses mais elevadas de Cd podem conduzir à perda de líquido extensa, acidose metabólica, edema facial, hipotensão, alteração do metabolismo de cálcio e zinco e falência de múltiplos órgãos [Okuda *et al.*, 1997].

#### 4.2.2. Toxicidade crónica

A exposição a longo prazo ao Cd e seus compostos tanto por via oral como inalatória provoca um vasto número de consequências, na medida em que este metal possui a capacidade de afectar diversos órgãos e tecidos, preferencialmente os rins e fígado. Contudo, os testículos, os pulmões, sistema nervoso central, esqueleto, pâncreas, tiróide, glândula supra-renal e glândula mamária podem ser também afectados [Fernandes *et al.*, 2007a; Kippler *et al.*, 2009; Ohrvik *et al.*, 2011].

##### 4.2.2.1. Efeitos renais

Inúmeros estudos experimentais [Yamano *et al.*, 1998; Brzoska *et al.*, 2003; Haouem *et al.*, 2007] como epidemiológicos [Akesson *et al.*, 2005; Haswell-Elkins *et al.*, 2008] têm dado bastante relevância ao rim como sendo um órgão crítico no que se refere à toxicidade exercida pelo Cd. Os primeiros sintomas de nefrotoxicidade associados à disfunção dos túbulos proximais são proteinúria tubular, aminoacidúria e glicosúria. Estes surgem quando os níveis de Cd nos tecidos renais atingem uma concentração crítica. De facto, a sensibilidade dos rins está associada com o metabolismo do Cd, concretamente na fase de degradação do complexo Cd-MT nos lisossomas das células tubulares, local onde o Cd(II) é libertado, estimulando a síntese de metalotioneínas endógenas. Contudo, estudos mostraram que quando o conteúdo em Cd nos rins atinge valores entre 50 a 300 µg/g tecido, ocorre uma saturação na acção das MTs, conduzindo ao aparecimento de lesões renais [Sabolic *et al.*, 2010; Johri *et al.*, 2010]. Outros sintomas como poliúria e diminuição da absorção do fosfato podem ocorrer [Fernandes *et al.*, 2007a].

Em exposições elevadas ao Cd, pode ocorrer ainda uma diminuição na taxa de filtração glomerular devido à degeneração e atrofia dos túbulos proximais e à fibrose intersticial do rim [ATSDR, 2008]. Adicionalmente, evidências epidemiológicas têm sugerido que pessoas com diabetes são mais susceptíveis em desenvolver disfunção renal induzida pelo Cd [Nawrot *et al.*, 2010].

#### 4.2.2.2. Efeitos hepáticos

Apesar de estar descrito que o Cd pode provocar lesões hepáticas em animais, em doses elevadas, existem poucas evidências de lesões em humanos expostos, tanto por exposição ambiental como ocupacional [Bernard, 2008]. Em animais, sabe-se que a exposição ao Cd causa extensas lesões a nível do fígado, como a necrose dos hepatócitos, distúrbios a nível metabólico e peroxidação membranar. É descrito que o Cd consegue ainda destruir a membrana celular hepática e induzir a peroxidação lipídica, afectando assim a configuração e funcionamento da mitocôndria [Pourahmad e O'Brien, 2000; Koyu *et al.*, 2006; Belyaeva *et al.*, 2008]. Alterações no índice de massa corporal, assim como diminuição dos níveis de triglicéridos e colesterol têm sido também reportados [Fernandes *et al.*, 2007a].

#### 4.2.2.3. Efeitos ósseos

Em animais de experiência e humanos, a exposição a longo-prazo ao Cd demonstrou levar à acumulação deste metal no esqueleto, predominantemente em fêmeas, a uma rápida perda de cálcio dos ossos e a sua excreção pela urina, aumentando o risco de litíase renal, osteomalácia e osteoporose [Sabolic *et al.*, 2010]. Os efeitos tóxicos provocados pelo Cd parecem estar relacionados com a interferência a nível do metabolismo do cálcio ou interferência indirecta no sistema renal. Na verdade, uma exposição contínua ao Cd conduz a disfunção renal tendo como consequência a diminuição da concentração de vitamina D produzida. Deste modo, ocorrem alterações nos mecanismos de reabsorção renal de cálcio, verificando-se um desequilíbrio na homeostasia. Como tentativa de manter o equilíbrio, ocorre uma contínua e exacerbada reabsorção óssea [Fernandes *et al.*, 2007a].

Estudos epidemiológicos têm vindo a associar a exposição ao Cd com o aumento da absorção óssea e a diminuição da densidade mineral em mulheres de meia-idade e idosas. Segundo estes, existem evidências de que o Cd afecta directamente o sistema ósseo. Contudo, o mecanismo segundo o qual o Cd afecta a fisiologia do osso não é ainda totalmente entendido [Kazantzis, 2004; Akesson *et al.*, 2006]. Uma publicação recente verificou uma relação dose-resposta entre o risco de desenvolver osteoporose e os níveis urinários de Cd, em indivíduos ocupacionalmente expostos [Nawrot *et al.*, 2010].



#### 4.2.2.4. Efeitos cardiovasculares

Na literatura podem encontrar-se alguns estudos sugerindo que a exposição ao Cd poderá ter efeitos a nível do sistema cardiovascular, mas tal facto é ainda controverso. Alguns autores têm mostrado em modelos animais que a exposição ao Cd pode aumentar o risco de aterosclerose. No entanto, estes resultados não foram ainda confirmados no Homem [Andujar *et al.*, 2010].

Nos vários estudos publicados, existem ainda muitas divergências devido à maioria possuir limitações metodológicas, como por exemplo, a falta de medidas padronizadas como a pressão arterial [Andujar *et al.*, 2010]. Recentemente, um estudo epidemiológico realizado na Bélgica em 476 indivíduos com exposição ambiental baixa ao Cd e em 480 indivíduos com exposição ambiental elevada, não encontrou nenhum aumento de risco de morte por doenças cardiovasculares entre os dois grupos estudados [Nawrot *et al.*, 2008].

#### 4.2.2.5. Efeitos neurológicos

Embora a relação entre o Cd e a neurotoxicidade não tenha sido demonstrada de forma clara em humanos, esta tem sido observada em estudos com animais. Em ratos adultos, uma única exposição aguda como crónica, ao Cd, resultaram numa diminuição significativa da actividade motora. Efeitos como fraqueza, atrofia muscular e comportamentos agressivos têm sido também relatados [ATSDR, 2008].

A neurotoxicidade geralmente não está associada com a exposição ao Cd pela via inalatória, mas existem alguns estudos que se direccionaram para esse campo. Em relação à via oral, existem poucos estudos reportando uma associação entre a exposição ambiental ao Cd e a função neurológica [ATSDR, 2008].

#### 4.2.2.6. Efeitos na reprodução

Em animais, tanto fêmeas como machos, a exposição ao Cd mostrou afectar o sistema reprodutor [Sato *et al.*, 2002]. Efeitos sobre os testículos podem envolver a alteração das vias metabólicas de testosterona e, conseqüentemente, a diminuição funcional dos espermatozoides. O Cd pode ainda comprometer a permeabilidade da barreira dos túbulos seminíferos e provocar posteriormente graves lesões vasculares. Ao nível do ovário, pode ocorrer inibição do desenvolvimento de oócitos/ovócitos, redução da esteroidogénese, hemorragia no ovário e necrose [Thompson e Bannigan, 2008].

Estudos epidemiológicos verificaram a existência de níveis de Cd elevados em ovários de mulheres fumadoras em comparação a não fumadoras [Thompson e Bannigan, 2008]. A nível da exposição ao Cd, tanto por via oral como inalatória, não se verificou nos estudos existentes, nenhuma evidência clara entre essa exposição e os efeitos na reprodução [ATSDR, 2008].

#### 4.2.2.7. Efeitos na gravidez

Efeitos a nível teratogénico e no desenvolvimento foram observados em animais experimentais [Fernandes *et al.*, 2007a], embora os estudos refiram uma transferência limitada de Cd para o recém-nascido através da placenta e leite materno. Existem evidências de que a placenta sintetiza MTs, servindo como barreira parcial ao Cd e que durante a lactação o Cd é transportado do plasma materno para a glândula mamária, surgindo depois no leite materno [Honda *et al.*, 2003].

A exposição *in utero* ao Cd, em animais, resultou em reduções significativas da viabilidade das crias, peso corporal fetal, atrasos na ossificação e desempenho alterado em testes neurocomportamentais [ATSDR, 2008].

Diversos estudos epidemiológicos mostraram que exposição de mulheres grávidas ao Cd pode influenciar o resultado da gravidez e o peso do recém-nascido. De facto, um estudo realizado em mulheres grávidas habitantes de uma área próxima de uma fundição de cobre sugeriu que a exposição ao Cd pode influenciar o desenvolvimento de complicações na gravidez, tais como ameaça de aborto espontâneo e anemia [Tian *et al.*, 2009].

#### 4.2.2.8. Efeitos nas crianças

A exposição das crianças ao Cd difere da dos adultos em diferentes formas. De facto, as crianças são consideradas um grupo de risco susceptível à intoxicação por Cd, devido à sua elevada ingestão de líquidos e alimentos por unidade de peso corporal [Fernandes *et al.*, 2007a].

Até à data não existem dados conclusivos relativamente à absorção gastrointestinal de Cd em crianças, apenas existem evidências limitadas reportando que animais mais novos absorvem mais este elemento do que os adultos, indicando ainda que estes são ainda mais susceptíveis à perda de osso e à diminuição do comprimento ósseo [ATSDR, 2008].

As crianças parecem estar expostas ao Cd maioritariamente pela alimentação, não existindo dados acerca da absorção gastrointestinal deste metal neste grupo [ATSDR, 2008]. Nos bebés e crianças de 1ª infância, existe um risco acrescido de intoxicação através da ingestão de leite e produtos à base de cereais, apesar dos baixos valores de concentração referidos na literatura, visto este grupo apresentar uma alimentação baseada nestes produtos [Martins *et al.*, 2009].

### 5. Carcinogenicidade do cádmio: Generalidades

O Cd é considerado um potente cancerígeno humano segundo o IARC, *International Agency for Research on Cancer*, devido à associação deste metal com o aparecimento de cancro do pulmão, tumores nos rins e próstata [IARC, 1993]. Além disso, novos dados evidenciaram que a exposição humana ao Cd pode estar associada ainda ao cancro da mama e endométrio, mas a relação causa-efeito não foi ainda estabelecida [Waalkes, 2003; Hartwig, 2010].

A classificação do Cd como cancerígeno de categoria 1 para o Homem foi sustentada por fortes evidências da carcinogenicidade deste metal, tanto a nível epidemiológico através da associação entre exposição ocupacional ao Cd e cancro do pulmão, como experimental com a existência de fortes dados em roedores, tendo como órgão-alvo o sistema pulmonar [Waalkes, 2000]. De facto, o Cd mostrou induzir a formação de diversos tumores em órgãos/tecidos de roedores. Em ratos, vários compostos de Cd demonstraram produzir

adenocarcinomas do pulmão após inalação, tumores na próstata e pâncreas através de injeção subcutânea e a produção de tumores nos testículos após exposição oral. O Cd levou também à produção de tumores em vários locais de injeção, tipicamente sarcomas em ratos e ratinhos [Waalkes, 2000; Waisberg *et al.*, 2003].

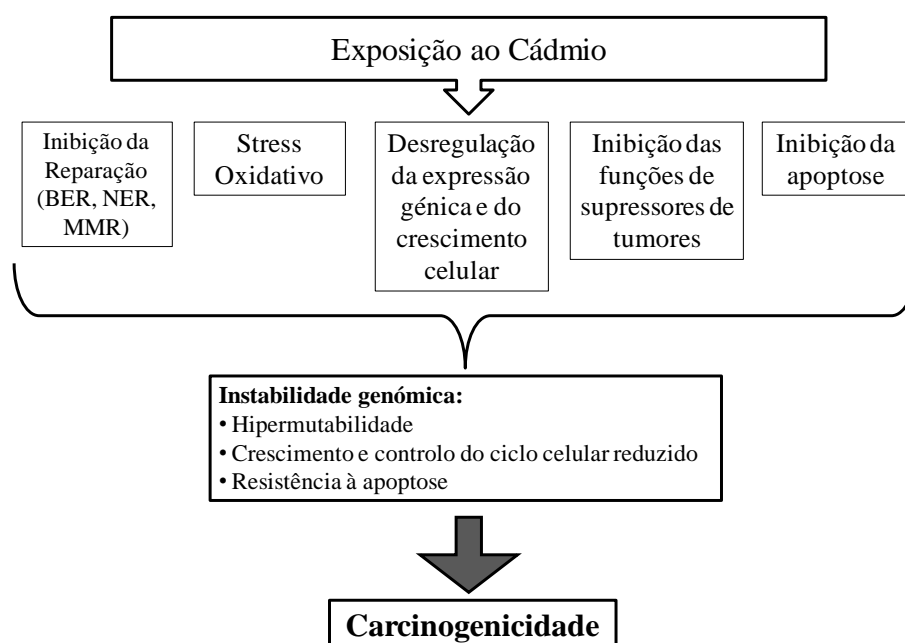
### 5.1. Modo de acção: Celular e molecular

A cancerigénese do Cd parece basear-se em múltiplos mecanismos distintos e complexos, ainda não completamente esclarecidos. De entre os mecanismos propostos pode-se referir 4 grupos: expressão génica aberrante, inibição da apoptose, inibição da reparação de DNA e indução de stress oxidativo (ROS), todos eles interligados entre si [Joseph, 2009]. Para além destes, outros mecanismos parecem estar também envolvidos na cancerigénese do Cd, mas em menor grau como a metilação aberrante do DNA, desregulação endócrina, proliferação celular e desregulação de caderinas-E [Waisberg *et al.*, 2003; Joseph, 2009].

Em estudos experimentais, o Cd é considerado um cancerígeno completo, não possuindo um único mecanismo simples de acção devido aos seus múltiplos alvos moleculares [Waisberg *et al.*, 2003]. Curiosamente, o Cd é um agente cancerígeno não genotóxico de forma directa, sendo não mutagénico em ensaios com bactérias e um mutagénico fraco e/ou limitado em células de mamíferos [Bertin e Auerbeck, 2006]. Contudo, comprovou-se que compostos de Cd conseguem ser co-mutagénicos em células de mamíferos quando combinados com agentes genotóxicos (*e.g.* agentes alquilantes de DNA e radiação UV), sendo esta propriedade explicada pela inibição dos processos de reparação do DNA por este metal [Hartwig e Schwerdtle, 2002]. O Cd mostrou interferir na maioria das vias de reparação do DNA nomeadamente na reparação por excisão de nucleótidos (NER), reparação por excisão de bases (BER) e ainda na reparação por *mismatch repair* (MMR). Para além disso, compostos de Cd mostraram induzir efeitos clastogénicos como aberrações cromossómicas e micronúcleos, sendo estes efeitos mais evidentes em ensaios *in vivo* com roedores [Hartwig, 2010]. A Figura 1 sumariza os mecanismos de acção do Cd.

A cancerigénese do Cd pode iniciar-se com a inibição do sistema antioxidante celular conduzindo ao aumento do stress oxidativo. Simultaneamente, com o aumento de ROS e a inibição da reparação genética ocorre uma acumulação de lesões no DNA, as quais podem produzir mutações e, consequentemente, promover o crescimento tumoral mediante sinais

mitóticos evocados pela indução de genes de resposta imediata (proto-oncogenes como *c-fos*, *c-jun* e *c-myc*) e pela inibição da metilação do DNA. O desenvolvimento para neoplasia pode ser conduzido pela interferência do Cd com a função de caderinas-E e desregulação da adesão celular. A indução de apoptose pode diminuir o número de células direccionadas para o crescimento neoplásico, mas também permitir que algumas das células adaptadas ao Cd consigam escapar à morte [Waisberg *et al.*, 2003].



**Figura 1.** Mecanismos propostos para a cancerigénese do cádmio. Adaptado de Hartwig (2010).

Como se pode constatar, o stress oxidativo e a inibição da reparação do DNA parecem desempenhar um papel fundamental na cancerigénese induzida pelo Cd. Porém, como o Cd não é um metal redox activo, a produção de ROS deve-se essencialmente a mecanismos indirectos. De facto, na literatura existente é reportada a formação de ROS tanto *in vitro* [Joseph *et al.*, 2001; Shih *et al.*, 2004; Lopez *et al.*, 2006; Belyaeva *et al.*, 2006; Nzengue *et al.*, 2008] como *in vivo* [Chater *et al.*, 2008] e o seu aparecimento é interpretado pela inibição das defesas antioxidantes como a glutathiona, enzimas antioxidantes (catalase, glutathiona peroxidase e superóxido dismutase) e ainda por outros mecanismos indirectos envolvendo a

substituição de metais *Fenton* (e.g. ferro) de proteínas [Hartwig, 2010] bem como pela inibição da cadeia de transporte mitocondrial [Liu *et al.*, 2009]. Tem sido ainda sugerido que mecanismos de toxicidade aguda envolvendo a depleção de glutatona e ligação a proteínas com grupos sulfidrílo, resultam no aumento da produção de ROS (ião superóxido, peróxido de hidrogénio e radicais hidroxilo). Para além disso, as ROS têm sido implicadas na nefrotoxicidade crónica e imunotoxicidade induzidas pelo Cd [Flora e Pachauri, 2010].

Mecanismos de competição com sistemas de transporte de elementos essenciais, como o zinco e o cálcio, têm sido também sugeridos como vias de iniciação da cancerigénese induzida pelo Cd. Como vias de entrada de Cd(II) nos diversos tecidos, são frequentemente sugeridos os canais de  $\text{Ca}^{2+}$ , sendo que ambos possuem raios iónicos similares. O Cd(II) consegue ainda substituir o  $\text{Ca}^{2+}$  na sinalização celular e o  $\text{Zn}^{2+}$  em diversas enzimas e factores de transcrição, o que pode contar para alguns dos efeitos biológicos do Cd [Thevenod, 2010].

## 5.2. Estudos epidemiológicos

Diversas avaliações epidemiológicas de risco de cancro em populações ocupacionalmente e ambientalmente expostas ao Cd, têm vindo a ser relatadas e revistas na literatura. Silvera e Rohan (2007) resumiram vários estudos efectuados entre as décadas de 70 e 90, associando a exposição ao Cd e risco de cancro em diversos órgãos, denotando o facto de que a maioria é focada no cancro de pulmão e próstata. Dos estudos referidos sobre a relação de cancro no pulmão com exposição ocupacional ao Cd [Lemen *et al.*, 1976; Sorahan e Waterhouse, 1983; Elinder *et al.*, 1985; Sorahan, 1987; Kazantzis *et al.*, 1988; Stayner *et al.*, 1992; Sorahan *et al.*, 1995], apenas um [Elinder *et al.*, 1985] não mostrou associação positiva. Todos os outros estudos mostraram um aumento significativo do risco de cancro do pulmão associado a uma exposição relativamente elevada ao Cd. Em relação ao cancro da próstata, apenas dois dos estudos reportados na publicação, um caso-controlo [West *et al.*, 1991] e outro coorte [Sorahan e Waterhouse, 1983] apontaram para uma associação significativa entre a exposição ao Cd e risco de cancro, sendo que no caso de West *et al.* (1991) a exposição foi associada com a ingestão de Cd via dieta.

Nos últimos anos, muitos estudos do foro epidemiológico têm surgido, avaliando a relação da exposição ao Cd por diversas fontes com o aparecimento de cancro em vários

órgãos/tecidos em diversas populações de diferentes países. A Tabela IV resume resultados de alguns estudos epidemiológicos de avaliação do risco de cancro por exposição ao Cd.

Como se pode verificar pela Tabela IV, a maioria dos estudos encontraram uma associação positiva entre a exposição ao Cd e a incidência de cancro nos rins, próstata, pulmões, pâncreas, mama, endométrio e bexiga. Apenas dois estudos caso-controlo referentes ao cancro do endométrio não apresentaram nenhuma relação [Heilier *et al.*, 2006; Itoh *et al.*, 2008]. No entanto, estes mostraram ser limitados e inconsistentes. Relativamente às evidências de risco de cancro da mama por exposição ao Cd, estas são discutidas em mais profundidade na Secção 6.

Apesar de existir uma vasta literatura sobre o Cd a vários níveis, ainda existe pouca informação acerca da relação entre exposição ao Cd via dieta e o risco de cancro. Dos estudos mencionados (Tabela IV), apenas o estudo de coorte realizado por Akesson *et al.* (2008), efectua uma avaliação do potencial da ingestão de Cd relativamente ao aparecimento de cancro do endométrio. Uma associação estatisticamente significativa entre a ingestão de Cd e o risco de cancro do endométrio entre as mulheres japonesas em pré-menopausa foi encontrada, após ajuste do modelo para os grupos alimentares (vegetais, batatas e grãos integrais) que contribuem para a ingestão de Cd. O possível efeito do tabagismo foi tido em conta na estimativa do risco. Um estudo de coorte recente, Julin *et al.* (2011), avaliou a associação entre a exposição ao Cd na dieta e o risco de cancro no ovário em mulheres suecas. O Cd foi estimado através de um questionário de frequência alimentar, não tendo sido encontrada nenhuma associação, sugerindo que a exposição do Cd via dieta não é susceptível de ter um papel importante no desenvolvimento do cancro do ovário.

**Tabela IV.** Estudos epidemiológicos de avaliação do risco de cancro por exposição ao cádmio.

Referências	Tipo de estudo	População em estudo	Tamanho da amostra	Tipo de cancro	Risco de cancro	Fonte de exposição
<b>Antila <i>et al.</i>, 1996</b>	Caso-controlo	Mulheres, Finlândia	<i>n</i> =43 casos, <i>n</i> =32 controlos	Mama	- <sup>a</sup>	Não ocupacional
<b>Pesch <i>et al.</i>, 2000</b>	Caso-controlo	Homens e mulheres, Alemanha	<i>n</i> =935 casos, <i>n</i> =4298 controlos	Rins	+ <sup>b</sup>	Ocupacional
<b>Hu <i>et al.</i>, 2002</b>	Caso-Controlo	Homens e mulheres, Canadá	<i>n</i> =1279 casos, <i>n</i> =5370 controlos	Rins	+ <sup>b</sup>	Ocupacional
<b>Zeng <i>et al.</i>, 2004</b>	Subcoorte	Homens, China	<i>n</i> =96 controlos, <i>n</i> =75 casos <sup>c</sup> , <i>n</i> =126 casos <sup>d</sup>	Próstata	+	Ambiental
<b>Heilier <i>et al.</i>, 2006</b>	Caso-controlo	Mulheres, Bélgica	<i>n</i> =119 casos, <i>n</i> =25 controlos	Endométrio	-	Não ocupacional
<b>Kriegel <i>et al.</i>, 2006</b>	Caso-Controlo	Homens e mulheres, Egipto	<i>n</i> =31 casos, <i>n</i> =52 controlos	Pâncreas	+	Ambiental
<b>McElroy <i>et al.</i>, 2006</b>	Caso-Controlo	Mulheres, USA, NHANES*	<i>n</i> =254 casos, <i>n</i> =246 controlos	Mama	+ <sup>f</sup>	Não ocupacional
<b>Nawrot <i>et al.</i>, 2006</b>	Coorte	Homens e mulheres, Bélgica	<i>n</i> = 994 <sup>e</sup>	Pulmão	+	Ambiental
<b>Kellen <i>et al.</i>, 2007</b>	Caso-Controlo	Homens e mulheres, Bélgica	<i>n</i> =172 casos, <i>n</i> =359 controlos	Bexiga	+	Ambiental
<b>Akesson <i>et al.</i>, 2008</b>	Coorte	Mulheres na pré-menopausa, Suécia	<i>n</i> =30210, <i>n</i> =378 casos	Endométrio	+ (QFA)	Ambiental/Dieta
<b>Itoh <i>et al.</i>, 2008</b>	Caso-Controlo	Mulheres inférteis, Japão	<i>n</i> =54 casos, <i>n</i> =74 controlos	Endométrio	-	Ambiental/Não ocupacional
<b>Jackson <i>et al.</i>, 2008</b>	Subcoorte	Mulheres, USA	<i>n</i> =1425	Endométrio	+	Não ocupacional
<b>Chen <i>et al.</i>, 2009</b>	Caso-Controlo	Homens, Taiwan	<i>n</i> =261 casos, <i>n</i> =267 controlos	Próstata	+ (QFA) <sup>g</sup>	Ambiental/Não ocupacional
<b>Gallagher <i>et al.</i>, 2010</b>	Caso-controlo	Mulheres, Long Island (USA)	<i>n</i> =100 casos, <i>n</i> =98 controlos	Mama	+ <sup>f</sup>	Ambiental
<b>Julin <i>et al.</i>, 2011</b>	Subcoorte	Mulheres, Suécia	<i>n</i> =60,889	Endométrio	- (QFA)	Dieta
<b>Mannetje <i>et al.</i>, 2011</b>	Caso-controlo	Homens e mulheres, Europa do leste e Reino Unido	<i>n</i> =2853 casos, <i>n</i> =3104 controlos	Pulmão	+	Ocupacional
<b>Strumylaite <i>et al.</i>, 2011</b>	Caso-controlo	Mulheres, Lituânia	<i>n</i> =57 casos, <i>n</i> =51 controlos	Mama	+	Não ocupacional

(+) Associação significativa entre exposição ao Cd e risco de cancro; (-) Ausência de associação positiva; <sup>a</sup> Dados obtidos não foram suficientes para estabelecer uma correlação; <sup>b</sup> Verificou-se apenas a níveis elevados de exposição; <sup>c</sup> área com níveis de poluição média; <sup>d</sup> área com níveis de poluição elevados; <sup>e</sup> 521 residentes numa área de alta exposição/473 residentes numa área de baixa exposição; <sup>f</sup> Verificou-se um aumento significativo do risco de cancro de mama com elevados níveis urinários de Cd; <sup>g</sup> Fraca associação positiva. \*NHANES - *The National Health and Nutritional Examination Survey*.



## 6. Glândula mamária como possível alvo para os efeitos deletérios induzidos pelo cádmio

Dados convincentes, têm surgido na comunidade científica, evidenciando uma possível relação entre a exposição ao Cd e os efeitos deletérios no tecido mamário, incluindo o aparecimento de cancro. Níveis de Cd foram encontrados em quantidades consideráveis no tecido mamário de mulheres de diferentes regiões [Antila *et al.*, 1996; Strumylaite *et al.*, 2010; Strumylaite *et al.*, 2011] e uma série de estudos realizaram a quantificação de Cd no leite humano [Honda *et al.*, 2003; Al-Saleh *et al.*, 2003; Turconi *et al.*, 2004; Kippler *et al.*, 2009; Garcia-Esquinas *et al.*, 2011; Orun *et al.*, 2011]. A Tabela V resume alguns desses estudos epidemiológicos. Os níveis no leite humano normalmente não são muito elevados e são mais baixos do que os encontrados no tecido mamário, o que sugere uma possível bioacumulação de Cd na glândula mamária [Antila *et al.*, 1996; Petersson e Oskarsson, 2000].

**Tabela V.** Estudos epidemiológicos de avaliação dos níveis de cádmio presentes em leite humano.

Referências	População	Amostra biológica	Níveis de cádmio (concentração)	Fonte de exposição
Al-Saleh <i>et al.</i> , 2003	N= 171 Mulheres saudáveis lactantes (15 – 51 anos), Arábia Saudita	Leite materno	1,732 µg/L ± 1,691 *	Não ocupacional
Honda <i>et al.</i> , 2003	N= 68 Mulheres (19-38 anos), Japão	Leite materno	0,28 µg/L ± 1,82*	Não ocupacional
Turconi <i>et al.</i> , 2004	N=143 mulheres, Itália	Leite materno	1,00 µg/L (1,0-20,0) <sup>#</sup>	Não ocupacional
Kippler <i>et al.</i> , 2009	N=123 Mulheres, Bangladeshi	Leite materno	0,14 µg/Kg (0,050-1.0) <sup>#</sup>	Ambiental
Garcia-Esquinas <i>et al.</i> , 2011	N= 100 Mulheres (terceira semana de pós-parto), Espanha	Leite materno	1,31 µg/L (IC 95%: 1,15 – 1,48) **	Ambiental/ Não ocupacional
Orun <i>et al.</i> , 2011	N=144 mulheres, Turquia	Leite materno	0,67 µg/L (0,2-43,0) <sup>#</sup>	Não ocupacional

\*Média + desvio-padrão; # Valores medianos (Min-Máx); \*\* Valores médios

Como já foi referido anteriormente, tem sido sugerido por alguns autores [Johnson *et al.*, 2003; Milnerowicz e Chmerek, 2005; Ohrvik *et al.*, 2006; Kippler *et al.*, 2009; Ohrvik *et al.*, 2011] que o Cd é capaz de acumular-se na glândula mamária, mas pouco se conhece acerca dos seus efeitos na função fisiológica desta glândula. De acordo com a literatura disponível, o Cd afecta os níveis de caseína nas glândulas mamárias de não lactentes [Johnson *et al.*, 2003], bem como a composição de ácidos gordos em leite de ratos [Grawe *et al.*, 2004], indicando que o Cd retido no tecido mamário em lactação pode interferir em vários processos intracelulares. Estudos em ruminantes, roedores e humanos têm demonstrado que o Cd é fracamente distribuído para o leite materno sugerindo que a glândula mamária pode agir como uma barreira, protegendo os seres mais novos, em fase de amamentação, da exposição ao Cd [Ohrvik *et al.*, 2006]. Segundo estudos em roedores lactentes, uma fracção considerável de Cd administrado é sequestrada nas glândulas mamárias [Ohrvik *et al.*, 2011]. Esta retenção de Cd pode estar relacionada com a ligação deste metal a proteínas de elevado peso molecular no tecido mamário, como as MTs e a uma diminuição na função mamária [Ohrvik *et al.*, 2011; Milnerowicz e Chmerek, 2005].

Por outro lado, estudos experimentais em modelos celulares têm evidenciado que o Cd, de forma similar ao estradiol, consegue induzir a proliferação celular [Garcia-Morales *et al.*, 1994; Brama *et al.*, 2007], aumentar a transcrição e expressão de genes reguladores de estrogénios como os receptores de progesterona [Garcia-Morales *et al.*, 1994] e activar os receptores de estrogénios alfa (ER $\alpha$ ) [Garcia-Morales *et al.*, 1994; Stoica *et al.*, 2000]. Um estudo recente, Benbrahim-Tallaa *et al.* (2009), utilizando células epiteliais mamárias humanas, MCF10A, expostas a baixas concentrações de Cd, demonstrou que este metal tóxico transforma estas células num fenótipo canceroso através de um mecanismo que não requer ER- $\alpha$ . Liu *et al.* (2008) mostraram que o Cd em células cancerígenas mamárias provoca uma rápida activação de cinases extracelulares, sugerindo uma sinalização membranar mediada, possivelmente, por interacção com ER $\alpha$  membranares. Em ensaios *in vivo*, o Cd demonstrou mimetizar os efeitos estrogénicos em órgãos-alvo de animais em doses similares à TWI proposta pela WHO [Johnson *et al.*, 2003]. Contudo, apesar destes resultados, encontram-se publicados na literatura observações inconsistentes e mesmo inconclusivas acerca da actividade estrogénica do Cd, *in vitro* e *in vivo* [Silva *et al.*, 2006; Zang *et al.*, 2009; Ali *et al.*, 2010]. Em células humanas mamárias cancerosas, MCF7, níveis subtóxicos de Cd demonstraram suprimir a função da p53 e induzir alterações conformacionais em proteínas p53, *wild-type* [Meplan *et al.*, 1999].

Um dos primeiros estudos epidemiológicos reportados na literatura, Antila *et al.* (1996), tentaram averiguar a existência de uma associação entre o Cd e o cancro de mama, tendo analisado tecidos mamários de 43 pacientes com cancro de mama e de 32 controlos. Foram encontrados valores de Cd elevados para as amostras de tecido mamário dos pacientes com cancro. Contudo, o nível médio de Cd não diferia dos níveis presentes nos controlos. A correlação entre o tabagismo, estadiamento do cancro e receptores de estrogénio foi avaliada. Os resultados obtidos neste estudo não comprovaram o papel do Cd no cancro da mama. Já no estudo caso-controlo, realizado por McElroy *et al.* (2006), verificou-se que as mulheres de Wisconsin, USA, no quartil mais elevado dos níveis urinários de Cd possuíam o dobro do risco de cancro de mama (estatisticamente significativo) comparado com o quartil mais baixo, após o ajustamento dos factores de risco como o tabagismo. Em 2010, Gallagher *et al.* examinaram a relação entre o cancro da mama e os níveis urinários de Cd, num estudo caso-controlo, compreendendo duas amostras de populações americanas, tendo chegado à mesma conclusão. A nível europeu, Strumylaite *et al.* (2011), investigaram os níveis de Cd em tecidos mamários, urina e sangue de 57 pacientes com cancro de mama e 51 pacientes com tumores benignos, tendo encontrado concentrações de Cd elevadas em tumores mamários e na urina de pacientes com cancro.

Mais recentemente, Adams *et al.* (2011), investigaram a hipótese de existência de uma relação entre a exposição ao Cd e a elevada densidade mamográfica (DM). A DM é considerada um forte marcador de risco de cancro da mama. A aparência radiográfica varia entre mulheres, devido a diferenças na composição do tecido e nas propriedades de atenuação radiográfica da gordura, estroma e epitélio. A DM reflecte variações na composição do tecido mamário, estando associada positivamente com o colagénio, células epiteliais e não epiteliais e negativamente com a gordura. É influenciada por hormonas, factores de crescimento e processos hormonais [Martin e Boyd, 2008]. No estudo de coorte realizado por Adams *et al.* (2011), 190 mulheres em pré-menopausa foram avaliadas em termos de DM e níveis de Cd na urina. Os autores verificaram uma associação positiva entre a concentração de Cd na urina e aumento da percentagem de DM, tendo sido factores como adiposidade e o *status* de fumador seleccionados como potenciais factores de confusão antes da análise e ajustados analiticamente.

Todos estes artigos referidos do foro epidemiológico sustentam uma possível relação entre a exposição ao Cd e o cancro da mama, sendo esta conclusão atenuada por algumas questões metodológicas como a diferença de idades entre os grupos comparados e o número

bastante pequeno de indivíduos participantes em alguns dos estudos [Antila *et al.*, 1996; Strumylaite *et al.*, 2011; Adams *et al.*, 2011]. No entanto, os diversos autores acima citados, advogam a necessidade de mais estudos numa tentativa de perceber quais os mecanismos envolvidos na carcinogenicidade mamária e do aumento de DM induzidos pelo Cd, bem como a relação entre a exposição ao Cd, a DM e a incidência de cancro de mama.

Todas estas observações, tanto experimentais como epidemiológicas reforçam a importância do Cd num contexto de toxicidade face ao tecido mamário. Porém, são ainda necessários mais estudos para tentar compreender os processos subjacentes à actuação do Cd na glândula mamária e sua retenção, bem como para perceber os mecanismos moleculares envolvidos na possível actividade estrogénica e esclarecer os dados discordantes existentes na literatura tanto em ensaios *in vitro* como *in vivo*.

## 7. Terapêutica por quelação para o metal cádmio

Numa tentativa de redução da acção tóxica do Cd em intoxicações agudas, na mobilização de Cd intracelular, na prevenção ou mesmo atenuação de toxicidade crónica tem sido sugerido o uso de agentes quelantes. De facto, a terapêutica por quelação é uma das formas mais eficazes de remover elementos tóxicos como o Cd de sistemas biológicos, envolvendo o uso de ligandos que promovem a excreção deste metal pesado. Diversos resultados experimentais, tanto *in vivo* como *in vitro*, têm demonstrado uma actuação positiva de diversos agentes quelantes na minoração dos efeitos deletérios do Cd [Zhukalin *et al.*, 2007]. Em ratos tratados com cloreto de cádmio ( $\text{CdCl}_2$ ), a administração de monoisoamil meso-2,3-dimercaptosuccinato (MiADMSA), um potente agente com capacidade de mobilizar o Cd, [Tandon *et al.*, 2003], demonstrou uma eficaz redução histopatológica nos sinais de apoptose e fragmentação do DNA [Yan *et al.*, 1997]. O uso de agentes como ácidos acrílicos contendo grupos sulfidrilo [Tandon *et al.*, 2000; Chatterjee *et al.*, 2004] têm demonstrado capacidade de sequestração de Cd intracelular tanto *in vivo* como *in vitro*. Em osteoblastos humanos (linha celular SAOS-2), Zhukalin *et al.* (2007), compararam a capacidade de dois agentes quelantes estruturalmente semelhantes e derivados de etanolamina face à citotoxicidade exercida pelo Cd, tendo observado que ambos reverteram os efeitos deste metal. Um outro estudo reportou que a administração de monometil DMSA (MmDMSA) e

monociclohexil *DMSA* (Mch*DMSA*) em ratinhos albinos após exposição por sete dias ao Cd, produziu reduções significativas dos níveis deste metal no organismo destes animais [Flora e Pachauri, 2010].

Actualmente, ainda não existe uma terapêutica efectiva contra a intoxicação com Cd e a que existe apenas aborda os sintomas. Como agentes mais comuns usados clinicamente em envenenamentos com metais pesados desde a Segunda Guerra Mundial têm-se: BAL (British Anti-Lewisite - 2,3-Dimercaprol);  $\text{CaNa}_2\text{EDTA}$  e deferoxamina. Contudo, nenhum dos fármacos disponíveis é eficaz contra uma intoxicação com Cd [Matovic *et al.*, 2011].

Nos últimos anos, a pesquisa em química inorgânica tem estudado uma variedade de ligandos quelantes nomeadamente os macrociclos, numa tentativa de modificar e controlar as propriedades de iões metálicos como o Cd(II) em sistemas biológicos. De facto, os macrociclos têm sido amplamente estudados como agentes quelantes para aplicações médicas uma vez que estes compostos podem proporcionar uma maior selectividade para iões metálicos essenciais e menor toxicidade. Além disso, os macrociclos formam geralmente complexos metálicos termodinamicamente mais estáveis do que aqueles formados a partir de ligandos análogos de cadeia aberta [Hancock e Martell, 1989; Mewis e Archibald, 2010].

Desta forma, propõe-se assim uma estratégia baseada num agente quelante, um macrociclo pentaaza contendo piridina, 3,6,9,12,18-pentaazabicyclo[12.3.1]octadeca-1(18),14,16-triene ([15]pyN<sub>5</sub>). E uma vez que os níveis de cálcio (Ca) podem influenciar os efeitos do Cd em sistemas biológicos [Sorensen *et al.*, 1984; Hinkle *et al.*, 1987; Zimmerhackl *et al.*, 1998], este quelante em estudo foi preparado na forma de sal de cálcio, o que pode melhorar a sua eficiência.

# OBJETIVO

O cádmio (Cd) é um metal tóxico capaz de se acumular na cadeia alimentar, sujeitando a população em geral aos seus efeitos deletérios. Trata-se de um agente cancerígeno humano, tendo vindo a ser sugerida recentemente a sua associação ao cancro de mama. Assim, é fundamental aumentar a compreensão sobre os efeitos toxicológicos do Cd em células mamárias humanas de origem benigna. As células mamárias humanas MCF10A, de origem não tumoral, constituem um modelo de referência representativo de células epiteliais da mama para o estudo de factores etiológicos do cancro de mama. Neste contexto, o presente trabalho teve como objectivo:

- Avaliar o perfil de citotoxicidade de cádmio ( $\text{CdCl}_2$ ) em células MCF10A, recorrendo a dois métodos complementares para avaliar a viabilidade celular – o ensaio de redução do MTT e ensaio de Cristal Violeta, avaliando-se também as alterações na morfologia celular.
- Avaliar a geração intracelular de ROS em células MCF10A expostas a  $\text{CdCl}_2$  através de ensaios de fluorescência com dihidrorodamina 123 (DHR123) e dihidroetídio (DHE).

No âmbito desta tese pretendeu-se também desenvolver uma estratégia para mitigar os efeitos deletérios de Cd em células MCF10A, focada na utilização de um agente quelante, mais concretamente um sal de cálcio do ligando macrocíclico  $[15]\text{pyN}_5$ . Neste sentido, o presente trabalho compreendeu os seguintes objectivos específicos:

- Simular a capacidade do ligando macrocíclico  $[15]\text{pyN}_5$  para complexar o Cd, tendo em conta as suas propriedades termodinâmicas, através do programa *HySS*.
- Avaliar o perfil de citotoxicidade do sal de cálcio de  $[15]\text{pyN}_5$  (ensaio do MTT).
- Avaliar o potencial citoprotector do sal de cálcio de  $[15]\text{pyN}_5$ , recorrendo a ensaios de viabilidade celular (MTT e Cristal Violeta) e à análise da morfologia celular.
- Avaliar a contribuição específica do ligando e da presença de cálcio para o efeito citoprotector do sal de cálcio de  $[15]\text{pyN}_5$  (ensaio de MTT).

# **MATERIAIS E MÉTODOS**



## 1. Materiais

### 1.1. Reagentes

Ácido acético 1%, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), tampão fosfato salino 0,01 M, pH 7,4 (PBS), tripsina de pâncreas suíno, *DMEM/Nutrient Mixture F-12 Ham* (DMEM/F12), solução penicilina-streptomicina, soro de cavalo, insulina de pâncreas bovino, hidrocortisona, toxina colérica de *vibrio cholerae*, factor de crescimento epidérmico humano (EGF), brometo tiazolil azul de tetrazólio (MTT), *Tert*-butilhidroperóxido (TBHP), cristal violeta (CV),  $\text{CdCl}_2 \cdot 2,5\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA}$ ,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  foram obtidos pela *Sigma-Aldrich*. Dimetilsulfóxido (DMSO), etanol e o ácido acético foram obtidos pela *Merck*. KOH e  $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$  foram obtidos pela *Riedel-de Haën*. As sondas dihidroetídio (DHE) e dihidrorodamina 123 (DHR123) foram obtidas pelas *Molecular Probes*.

### 1.2. Linha celular

No âmbito deste trabalho utilizou-se uma linha celular de epitélio mamário humano, não tumoral, MCF10A (CRL-10317), bem caracterizada e adquirida na ATCC<sup>1</sup>. Esta linha celular preserva a maioria das características bioquímicas e endócrinas do tecido mamário, tendo sido isolada a partir de tecido epitelial da glândula mamária de uma doente caucasiana de 36 anos, diagnosticada com doença fibrocística e sem historial familiar de neoplasia mamária [Soule *et al.*, 1990; Tait *et al.*, 1990].

As células MCF10A apresentam uma morfologia epitelial, caracterizando-se por um crescimento aderente formando uma monocamada de células poliédricas com núcleos redondos de tamanho homogéneo e com nucléolo proeminente. Estas células possuem ainda características de células luminiais ductais e não de células mioepiteliais [Tait *et al.*, 1990].

---

<sup>1</sup>ATCC: *American Type Culture Collection*; informação disponível sobre a linha celular em <http://www.atcc.org>.

## 2. Métodos

Todas as operações envolvidas no manuseamento das células e respectivos meios, foram realizadas de acordo com condições de assepsia, uso de material estéril e em câmara de fluxo laminar. Todos os reagentes e materiais utilizados foram adquiridos comercialmente estéreis, ou então foram esterilizados no próprio laboratório através de um processo de esterilização em autoclave a 121°C durante 30 minutos, excepto indicação em contrário. A água usada foi captada a partir de um sistema de purificação milli Q (*Millipore*, França). A manipulação das culturas celulares foi sempre exercida em câmaras de fluxo laminar vertical, sistematicamente desinfetada com etanol a 70% e com fungicida (Divoseptyl®, Diversey, Portugal). Uma protecção adicional foi conferida pela utilização da luz ultravioleta, a qual foi aplicada nas câmaras de fluxo laminar e em toda a sala de cultura durante 15 minutos, antes da manipulação das culturas celulares.

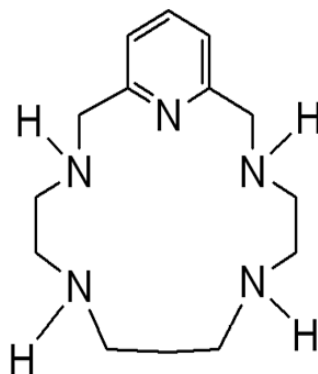
### 2.1. Síntese do macrociclo [15]pyN<sub>5</sub> e os seus respectivos sais

O ligando [15]pyN<sub>5</sub> (Figura 2) foi sintetizado no nosso laboratório de acordo com o método descrito em Fernandes *et al.* (2011), através de uma síntese assistida por um ião metálico, tendo-se utilizado, neste caso, Pb(II). O macrociclo foi preparado com um bom rendimento (85%) e caracterizado por espectroscopia de NMR <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C, com um espectrómetro *Bruker Avance 400*. Preparou-se uma solução aquosa do macrociclo (~2,5 × 10<sup>-3</sup> M), sendo a sua concentração real determinada por titulação potenciométrica. O sal de cálcio foi preparado a partir da adição de solução aquosa de Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (12,0 µM) previamente standardizada por titulação com Na<sub>2</sub>H<sub>2</sub>EDTA [Schwarzenbach e Flaschka, 1969], a uma solução aquosa de ligando (12,6 µM). Após agitação à temperatura ambiente, foi adicionada solução de KOH até se atingir um valor de pH 7,4. O solvente foi removido por evaporação a pressão reduzida e o resíduo foi retomado em 3 mL de H<sub>2</sub>O [Fernandes *et al.*, 2007b].

O complexo Cd[15]pyN<sub>5</sub> foi preparado como descrito para o sal de cálcio, mas usando Cd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> em vez de Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.

A solução de ligando [15]pyN<sub>5</sub> usada nas culturas celulares foi preparada através da adição de solução KOH, à solução aquosa do ligando até se atingir um valor de pH 7,4. O solvente foi removido por evaporação a pressão reduzida e o resíduo foi retomado em H<sub>2</sub>O.

Antes de serem utilizadas nas experiências em culturas celulares, todas as soluções foram esterilizadas por filtração com filtros 0,22 µm de poro.



**Figura 2.** Macrociclo [15]pyN<sub>5</sub>.

## 2.2. Curva de distribuição de espécies

As curvas de distribuição de espécies para as soluções aquosas contendo Cd<sup>2+</sup> (50 e 75 µM) e o sal de cálcio de [15]pyN<sub>5</sub> (25 e 50 µM), foram determinadas através do uso do programa HySS [Alderighi *et al.*, 1999]. As constantes de protonação do ligando e as constantes de estabilidade para os íons Cd<sup>2+</sup> e Ca<sup>2+</sup>, previamente reportadas [Fernandes *et al.*, 2011], foram utilizadas na determinação das curvas.

### 2.3. Cultura de células MCF10A

As células MCF10A foram cultivadas em *Dulbecco's Modified Eagle Medium nutrient mixture F-12 Ham* (DMEM/F12) suplementado com 5% de soro de cavalo, 1% de solução de antibióticos (penicilina-streptomicina), 10 µg/mL de insulina, 0,5 µg/mL de hidrocortisona, 20 ng/mL de factor de crescimento epidérmico humano (EGF) e 100 ng/mL de toxina colérica, de acordo com a informação publicada [Soule *et al.*, 1990].

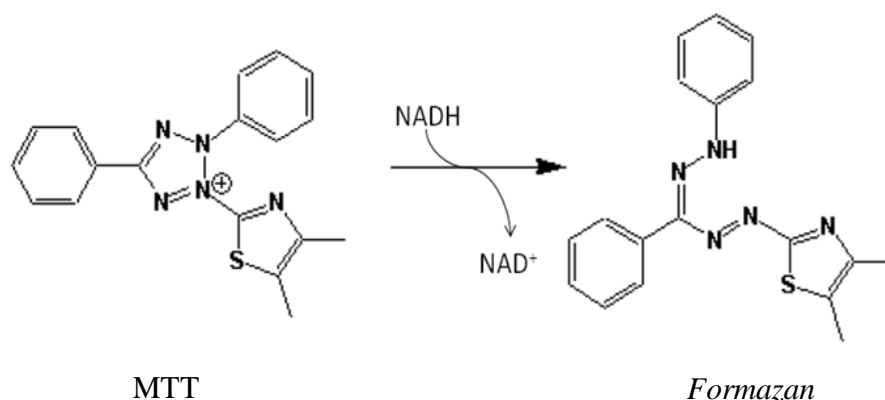
As células foram rotineiramente mantidas em frascos de cultura de 75 cm<sup>2</sup> (*Sarstedt*) a 37°C numa atmosfera humidificada com 5% CO<sub>2</sub>/95% ar. Ao atingirem uma confluência superior a 80%, procedeu-se à subcultura das mesmas através de um processo de desagregação enzimática, designado por tripsinização. Este consistiu na decantação do meio de cultura celular, lavagem das células com uma solução de verseno, previamente aquecida a 37°C e posterior adição de uma solução de tripsina (0,25 % (v/v), pH alcalino). A tripsinização foi promovida por incubação a 37°C (~5 min), sendo em seguida adicionada solução de DMEM/F12 com soro de cavalo e centrifugação das suspensões celulares obtidas (5 min a 900 rpm). Os sedimentos celulares resultantes foram reconstituídos em meio de cultura completo e as células distribuídas por novos frascos de cultura. A mudança do meio de cultura foi efectuada, em média, a cada três dias, sendo a frequência variável de acordo com a confluência apresentada pelas células.

### 2.4. Ensaio de Viabilidade Celular

Na avaliação da viabilidade celular foram realizados dois métodos. Usualmente, é recomendado o uso de duas metodologias para que haja uma avaliação correcta da citotoxicidade de um xenobiótico, na medida em que cada ensaio possui as suas próprias limitações e a medição de um efeito pode depender do método escolhido [Fernandes *et al.*, 2010b]. Assim, o ensaio do MTT, foi o primeiro a ser usado enquanto o ensaio de Cristal Violeta foi utilizado como método confirmatório.

### 2.4.1. Ensaio de redução do MTT

O ensaio do MTT (brometo tiazolil azul de tetrazólio) é um método colorimétrico que permite avaliar a citotoxicidade de um determinado composto através da medição da função mitocondrial de células metabolicamente activas. Este ensaio consiste na conversão intracelular de MTT (sal de cor amarela) a um produto de cor púrpura, *formazan*, pelas desidrogenases mitocondriais associadas à oxidação de NADH a NADPH, seguida de quantificação espectrofotométrica UV/Vísivel do produto formado (Figura 3) [Bopp e Lettieri, 2008; Oliveira *et al.*, 2009].



**Figura 3.** Redução do MTT em células viáveis pelas enzimas mitocondriais resultando na formação de um *formazan*.

A absorvância dos cristais de *formazan* produzidos no interior das células metabolicamente activas, reflecte indirectamente o número de células viáveis [Bopp e Lettieri, 2008]. Deste modo, quanto menor for a viabilidade celular, menor será a redução do MTT e menor o sinal espectrofotométrico.

#### 2.4.1.1. Determinação da viabilidade celular pelo ensaio de redução do MTT

Aproximadamente  $4,0-4,5 \times 10^3$  células foram cultivadas em 200  $\mu\text{L}$  de meio de cultura, em placas de 96 poços e incubadas por 48 horas a  $37^\circ\text{C}$  sob uma atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$ .

As culturas celulares com 48 horas de incubação foram expostas, durante 24 horas, aos compostos em estudo.

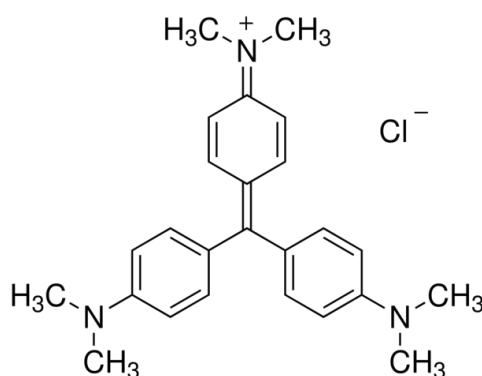
Após as 24 horas de incubação, as células foram lavadas com meio de cultura e foram aplicados 200  $\mu\text{L}$  de solução de MTT (dissolvido em meio de cultura numa concentração de 0,5 mg/mL). As placas foram incubadas por um período adicional de 2,5 h e posteriormente, cuidadosamente lavadas com PBS. Após uma secagem cuidadosa das mesmas, adicionou-se 200  $\mu\text{L}$  de dimetilsulfóxido (DMSO) a cada poço e homogeneizou-se bem de forma a solubilizar os cristais de *formazan* formados. A absorvância a 595 nm foi lida, num leitor de microplacas *Zenyth 3100 Multimode Detection (Anthos Labtec, Austria)* [Fernandes *et al.*, 2010a; Fernandes *et al.*, 2010b]. Aos valores de absorvância medidos foi subtraída a absorvância do DMSO e o resultado foi normalizado face ao valor de absorvância das culturas controlo, que correspondem a 100% de viabilidade celular.

Para cada situação testada, foram realizados pelo menos 2 ensaios independentes, cada um deles compreendendo 8 culturas em replicado.

O valor de  $\text{IC}_{50}$  do  $\text{CdCl}_2$  (concentração de Cd requerida para inibir 50% da viabilidade celular) foi determinado recorrendo ao software *Graph Pad Prism* (versão 5.01, E.U.A), por ajuste sigmoidal da curva dose-resposta utilizando uma equação logística de quatro parâmetros.

### 2.4.2. Ensaio de Cristal Violeta

O ensaio de Cristal Violeta (CV) é um método colorimétrico de determinação de células aderentes [Fernandes *et al.*, 2010b]. A quantificação espectrofotométrica das células aderentes reflecte indirectamente o número de células viáveis. O Cristal Violeta (Figura 4) é um composto capaz de atravessar as membranas celulares e nucleares, ligando-se inespecificamente ao DNA, RNA e proteínas [Chiba *et al.*, 1998; Mickuviene *et al.*, 2004]



**Figura 4.** Estrutura molecular do corante Cristal Violeta.

#### 2.4.2.1. Determinação da viabilidade celular pelo ensaio de Cristal Violeta

Aproximadamente  $3,5-4,0 \times 10^3$  células foram cultivadas em 200  $\mu\text{L}$  de meio de cultura, em placas de 96 poços, e incubadas por 48 horas a  $37^\circ\text{C}$  sob uma atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$ .

As culturas celulares com 48 horas de incubação foram expostas, durante 24 horas aos compostos em estudo.

Terminado o tempo de incubação, as células foram lavadas com PBS e fixadas com 100  $\mu\text{L}$  de solução de etanol a 96%, durante 10 minutos à temperatura ambiente. Após fixação das células, estas foram coradas com 200  $\mu\text{L}$  de solução Cristal Violeta 0,1% em etanol a 10%, durante 5 minutos à temperatura ambiente. Após lavagem do corante em excesso com água, adicionou-se 200  $\mu\text{L}$  de solução ácido acético 1% em etanol 96% a cada poço e homogeneizou-se bem de forma a solubilizar os cristais formados. A leitura das absorvâncias

foi realizada a 595 nm num leitor de microplacas *Zenyth 3100 Multimode Detection Microplate Reader* (Anthos Labtec, Austria) [Fernandes *et al.*, 2010b]. Aos valores de absorvância medidos foi subtraída a absorvância da solução de ácido acético 1% em etanol 96% e o resultado foi normalizado face ao valor de absorvância das culturas controlo, que correspondem a 100% de viabilidade celular.

Para cada situação testada, foram realizados pelo menos 2 ensaios independentes, cada um deles compreendendo 8 culturas em replicado.

O valor de IC<sub>50</sub> do CdCl<sub>2</sub> (concentração de Cd requerida para inibir 50% da viabilidade celular) foi determinado recorrendo ao software *Graph Pad Prism* (versão 5.01, E.U.A), por ajuste sigmoidal da curva dose-resposta utilizando uma equação logística de quatro parâmetros.

## **2.5. Avaliação da morfologia celular**

Aproximadamente  $3,5-4,0 \times 10^3$  células foram cultivadas em 200 µL de meio de cultura, em placas de 96 poços e incubadas por 48 horas a 37°C sob uma atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

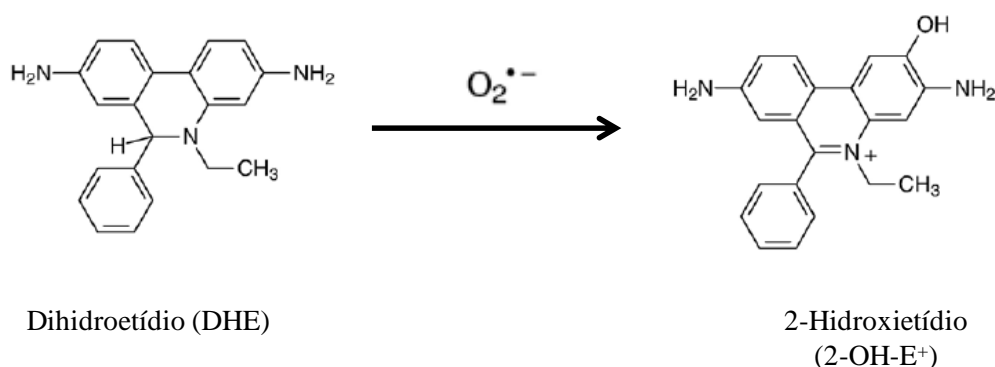
As culturas celulares com 48 horas de incubação foram expostas, durante 24 horas aos seguintes compostos: CdCl<sub>2</sub> (5, 10, 50, 75, 100 e 200 µM), sal de cálcio de [15]pyN<sub>5</sub> (25 µM) e em simultâneo ao CdCl<sub>2</sub> (75µM) e ao sal de cálcio de [15]pyN<sub>5</sub> (25 µM). Terminado o tempo de incubação, procedeu-se à visualização e captação das imagens representativas correspondentes de cada situação avaliada. Para tal foi utilizado um microscópio invertido de contraste de fase, *Olympus CK30*, com uma câmara digital acoplada (*Motic 2.0*), utilizando uma ampliação de 40x.



## 2.6. Determinação da formação de espécies reactivas de oxigénio

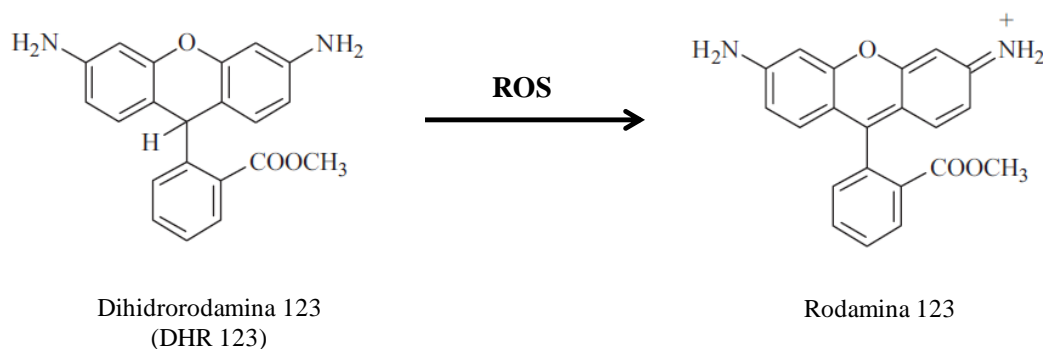
A produção de ROS intracelular foi medida com duas sondas de fluorescência, dihidroetídio (DHE) e dihidrorodamina 123 (DHR123). Ambas as sondas entram nas células e são oxidadas por ROS originando produtos fluorescentes [Gomes *et al.*, 2005; Wardman, 2007].

O DHE é uma sonda que reage com o radical anião superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), originando um produto fluorescente, o 2-hidroxi-etídio (Figura 5). Apesar de esta sonda poder reagir com outras ROS, podendo existir interferência com o pico de fluorescência, a oxidação de DHE é maioritariamente dependente de superóxido. A intensidade de fluorescência reflecte assim aproximadamente os níveis intracelulares de radical anião superóxido [Gomes *et al.*, 2005; Wardman, 2007].



**Figura 5.** Reacção do dihidroetídio com o anião superóxido originando um produto fluorescente, o 2-hidroxi-etídio.

No caso da sonda dihidrorodamina 123 (DHR123), esta reage com ROS, nomeadamente com o radical hidroxilo ( $OH^{\bullet}$ ), o anião radical carbonato ( $CO_3^{\bullet-}$ ), o radical dióxido de azoto ( $NO_2^{\bullet}$ ) e com o anião peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), oxidando-se a um produto fluorescente, a rodamina 123 (Figura 6) [Gomes *et al.*, 2005; Wardman, 2007].



**Figura 6.** Reacção da dihidrorodamina 123 com ROS originando o produto fluorescente, rodamina 123.

Ambas as sondas foram preparadas em DMSO (concentração de 10 mM) e armazenadas em alíquotas em atmosfera de  $N_2$ , a  $-18^\circ\text{C}$ .

Para o ensaio de DHR foram inoculadas cerca de  $8 \times 10^3$  células por poço, em placas de 96 poços (paredes pretas/fundo transparente, *Costar* 3603), durante 48h. Em seguida, as células foram expostas em simultâneo ao Cd (concentrações entre 0, 50, 100 e 200  $\mu\text{M}$ ) e a DHR123 (10  $\mu\text{M}$ ) durante 140 min. Terminado o tempo de incubação, as células foram cuidadosamente lavadas com PBS, tendo-se depois adicionado 200  $\mu\text{L}$  de PBS a cada poço. A leitura da fluorescência para determinação da oxidação de sonda a nível intracelular foi realizada no leitor de microplacas *Zenyth 3100 Multimode Detection* (*Anthos Labtec, Austria*), usando  $\lambda_{\text{excitação}}$  de 485 nm e  $\lambda_{\text{emissão}}$  de 535 nm.

Os resultados foram expressos em percentagem de unidades de fluorescência relativa (% UFR) em relação às células controlo, após subtracção do *background*. Foram realizadas duas experiências independentes, cada uma compreendendo seis replicados.

O ensaio de DHE foi realizado de acordo com o ensaio de DHR. A sonda DHE foi usada com uma concentração final de 10  $\mu\text{M}$  e a leitura da fluorescência foi realizada no leitor de microplacas *Zenyth 3100 Multimode Detection* (*Anthos Labtec, Austria*), usando  $\lambda_{\text{excitação}}$  de 485 nm e  $\lambda_{\text{emissão}}$  de 595 nm [Fernandes *et al.*, 2010a; Fernandes *et al.*, 2010b].

Os resultados foram expressos em percentagem de unidades de fluorescência relativa (% UFR) em relação às células controlo, após subtracção do *background*. Foram realizadas cinco experiências independentes, cada uma compreendendo seis replicados.

O composto *tert*-butil-hidroperóxido (TBHP), um análogo de hidroperóxidos lipídicos, foi utilizado como controlo positivo de oxidação de ambas as sondas, a uma concentração final de 1 mM [Fernandes *et al.*, 2010b].

### 3. Análise estatística

O teste de *Kolmogorov-Smirnov* foi usado para testar a normalidade das variáveis contínuas (% de viabilidade celular e % de UFR). Para as variáveis que apresentaram uma distribuição normal, as diferenças observadas nos valores médios dos resultados entre as culturas com diferentes tratamentos foram avaliadas pelo teste t de *Student* (amostras desemparelhadas). Para as variáveis com distribuição não-normal foi utilizado o teste de *Mann-Whitney*. Os níveis de significância considerados foram:  $P < 0,05$ ;  $P \leq 0,01$  e  $P \leq 0,001$ . Todas as análises foram realizadas com o pacote estatístico do *SPSS* (versão 17, *SPSS Inc., Chicago, IL, E.U.A.*).

# **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

## 1. Células MCF10A como modelo experimental

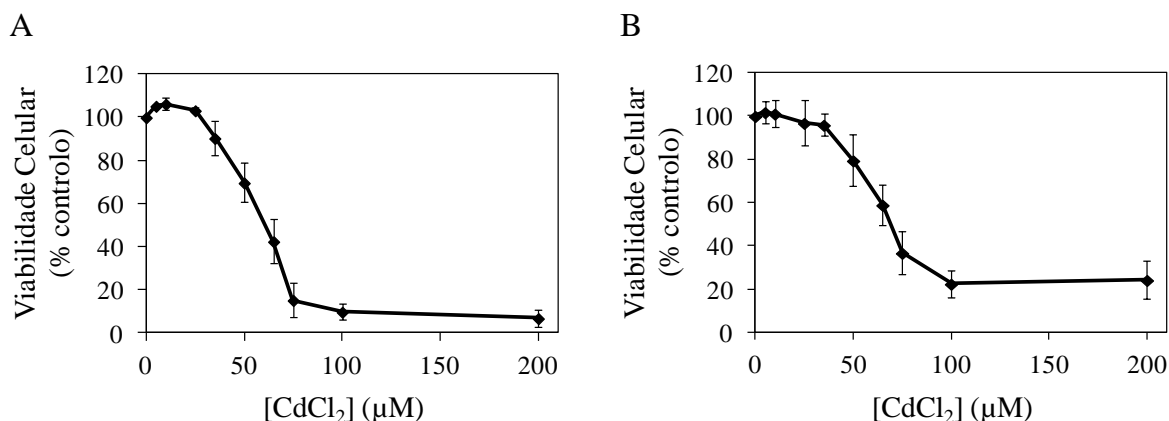
O Cd constitui um grave problema de saúde pública devido à sua persistência no ambiente e também à sua toxicidade em diferentes órgãos-alvo, sendo muito relevante em toxicologia ocupacional, ambiental e alimentar.

A consciencialização de uma possível ligação entre a exposição ao Cd e o desenvolvimento de efeitos tóxicos a nível da glândula mamária tem vindo a ser evidenciada. Porém, o papel do Cd na toxicidade em células mamárias não é ainda totalmente compreendido. Neste contexto, os efeitos celulares de uma exposição ao Cd foram estudados numa abordagem *in vitro*, utilizando células benignas de células epiteliais de mama, MCF10A.

Esta linha celular tem sido usada como modelo de referência de células mamárias humanas não tumorais e dentro das suas limitações pode contribuir para a elucidação de eventuais mecanismos deletérios induzidos pelo Cd no tecido mamário. É muito usada em estudos de cancro de mama como linha celular de controlo (não tumoral) para comparação com linhagens tumorais invasivas de mama e ainda, em estudos de demonstração da implicação de um determinado agente físico ou químico na transformação e cancerigénese da mama [Tait *et al.*, 1990; Ramachandran e You, 1999; Mei *et al.*, 2003; van Duursen *et al.*, 2003; Narayan *et al.*, 2004].

## 2. Avaliação da citotoxicidade do Cd(II) em células MCF10A

O perfil de citotoxicidade de Cd em células MCF10A está presente na Figura 7. Em primeiro lugar foi avaliada a viabilidade celular em termos de função mitocondrial através do ensaio de MTT (Figura 7A). O ensaio de coloração CV, baseado na determinação colorimétrica de células aderentes foi realizado como método de confirmação (Figura 7B).



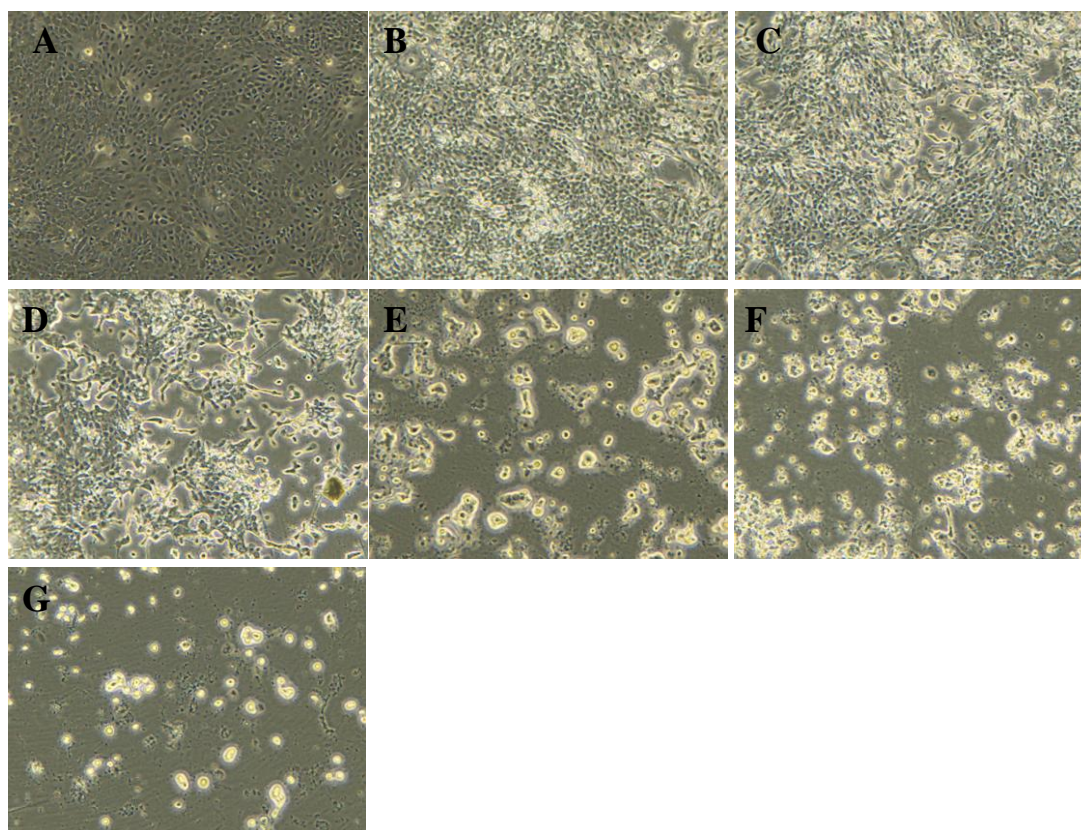
**Figura 7.** Viabilidade celular de células MCF10A, tratadas com diferentes concentrações de CdCl<sub>2</sub>, avaliada pelo ensaio de MTT (A) e pelo ensaio de CV (B). Os valores das viabilidades celulares (média  $\pm$  desvio padrão de pelo menos duas experiências independentes) são expressos como percentagens em relação às células controle não tratadas.

As concentrações mais baixas de CdCl<sub>2</sub> avaliadas (5 e 10 µM) em 24 horas de exposição promoveram um ligeiro aumento da viabilidade celular das células MCF10A relativamente aos controlos, especialmente no ensaio de MTT. De 35 a 200 µM, a viabilidade celular diminuiu de forma acentuada dose-dependente, em ambos os ensaios MTT e CV. As concentrações de CdCl<sub>2</sub>  $\geq$  50 µM levaram a uma redução significativa na viabilidade celular ( $P < 0,05$ ). Os valores de IC<sub>50</sub> foram calculados e ajustados com base numa equação logística de quatro parâmetros para os dados e os valores obtidos foram de 57 µM e 62 µM para os ensaios de MTT e CV, respectivamente.

A citotoxicidade do Cd foi já reportada por diversos estudos, os quais utilizaram diferentes metodologias de avaliação da viabilidade celular e linhas celulares [Beyersmann e Hechtenberg, 1997; Watjen *et al.*, 2002; Watjen e Beyersmann, 2004; Lawal e Ellis, 2010].

Como foi descrito por Beyersmann e Hechtenberg (1997), as linhas celulares humanas são tipicamente mais resistentes à citotoxicidade do Cd do que as células de roedores (cerca de 10 vezes). Neste estudo, as células MCF10A apresentaram valores de  $IC_{50}$  superiores aos descritos para um vasto número de linhas celulares, para um período de 24 horas de incubação [Beyersmann e Hechtenberg, 1997; Watjen *et al.*, 2002; Lawal e Ellis, 2010], sugerindo que estas células epiteliais humanas são relativamente mais resistentes aos efeitos deletérios do Cd. Contudo, deve ser mencionado que algumas linhas celulares humanas, como por exemplo fibroblastos VH16 e especialmente células de adenocarcinoma humano A549, mostraram ter valores de  $IC_{50}$  ainda maiores.

As alterações da morfologia celular de MCF10A após o tratamento com diferentes concentrações de Cd foram também avaliadas, estando representadas na Figura 8.



**Figura 8.** Morfologia das células MCF10A após tratamento com diferentes concentrações de  $CdCl_2$ , por 24 horas. A) células controlo não tratadas com  $CdCl_2$ ; B)  $CdCl_2$  - 5  $\mu M$ ; C)  $CdCl_2$  - 10  $\mu M$ ; D)  $CdCl_2$  - 50  $\mu M$ ; E)  $CdCl_2$  - 75  $\mu M$ ; F)  $CdCl_2$  - 100  $\mu M$ ; G)  $CdCl_2$  - 200  $\mu M$ . As imagens representativas foram capturadas por uma câmara digital acoplada a um microscópio invertido de contraste de fase (ampliação de 40x).

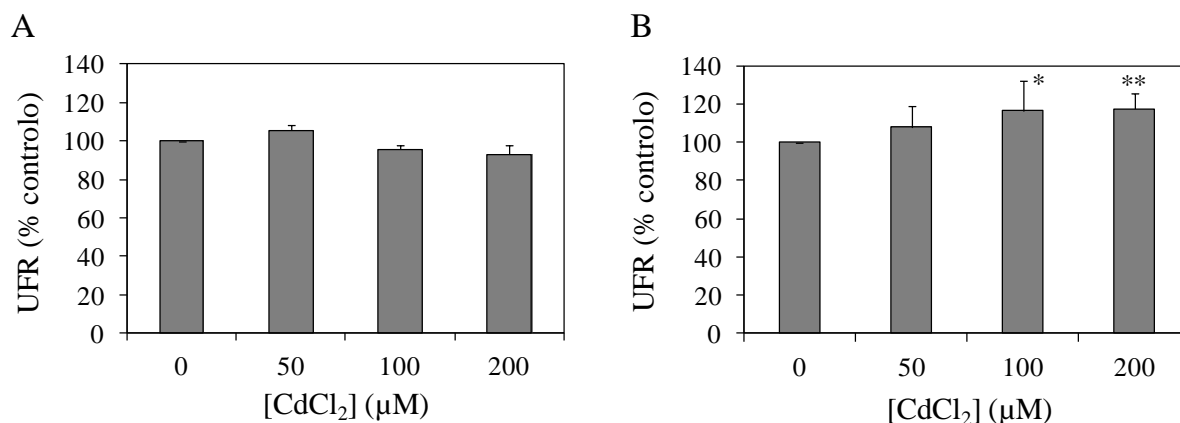
Embora não tenham sido observadas alterações significativas na morfologia das células MCF10A para concentrações mais baixas de Cd (5 e 10  $\mu\text{M}$ , 24 horas de incubação), concentrações iguais e superiores a 75  $\mu\text{M}$  levaram a mudanças morfológicas degenerativas marcadas e, simultaneamente a uma redução clara no número de células quando comparadas com as culturas controlo (células não tratadas com  $\text{CdCl}_2$ ).

### 3. Avaliação da geração de espécies reactivas de oxigénio (ROS)

Numa tentativa de identificação de mecanismos de citotoxicidade induzidos pelo Cd em células MCF10A, avaliou-se a geração intracelular de ROS. O Cd é um metal redox estável, incapaz de gerar ROS de forma directa, sendo que a ocorrência de diferentes mecanismos indirectos é importante para que ocorra stress oxidativo mediado pelo Cd. Entre os principais mecanismos destacam-se a depleção de defesas antioxidantes, a permuta pelo Cd de outros metais de transição responsáveis pela reacção de *Fenton*, interrupção da função mitocondrial, lesões em grupos tiol e inflamação [Liu *et al.*, 2009; Templeton e Liu, 2010]. Apesar de a geração de ROS pelo Cd já ser bastante estudada por vários autores, este tema permanece controverso. De facto, os resultados obtidos até agora são contraditórios e variam de acordo com tipo de célula, período de incubação, concentração de Cd(II) e da metodologia utilizada [Watjen e Beyersmann, 2004; Qu *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2009].

Na avaliação da formação de ROS pelo Cd foram utilizadas duas sondas sensíveis a espécies oxidantes, as sondas DHR123 e DHE. A sonda DHR123 é uma sonda capaz de entrar nas células e que sofre oxidação originando rodamina, um composto fluorescente. Esta oxidação pode ser mediada por diferentes ROS, proporcionando uma noção global do estado redox celular [Pias *et al.*, 2003]. No entanto, a DHR123 é considerada não reactiva para o anião superóxido [Wardman, 2007]. Desta forma, usou-se a sonda celular permeável DHE para assim avaliar os níveis intracelulares de anião superóxido. A sonda DHE é oxidada para um produto fluorescente, 2-hidroxietídio, e embora esta oxidação não seja absolutamente específica, é sobretudo superóxido-dependente [Peshavariya *et al.*, 2007; Fernandes *et al.*, 2010b]. Nestes ensaios, um curto período de incubação de 140 minutos foi escolhido devido à instabilidade das ROS e também para evitar uma morte celular acentuada. Os resultados obtidos são mostrados na Figura 9.





**Figura 9.** Efeito do cádmio (CdCl<sub>2</sub>) nos níveis intracelulares de ROS em células MCF10A, avaliado por oxidação de DHR123 (A) e DHE (B). Os dados correspondem à média  $\pm$  desvio padrão de unidades de fluorescência relativa (UFR) expressos em percentagem relativa ao controlo (células não expostas). Foram realizadas duas a cinco experiências independentes (\*P<0,05 e \*\*P<0,01 quando comparado com as células controlo não tratadas com CdCl<sub>2</sub>).

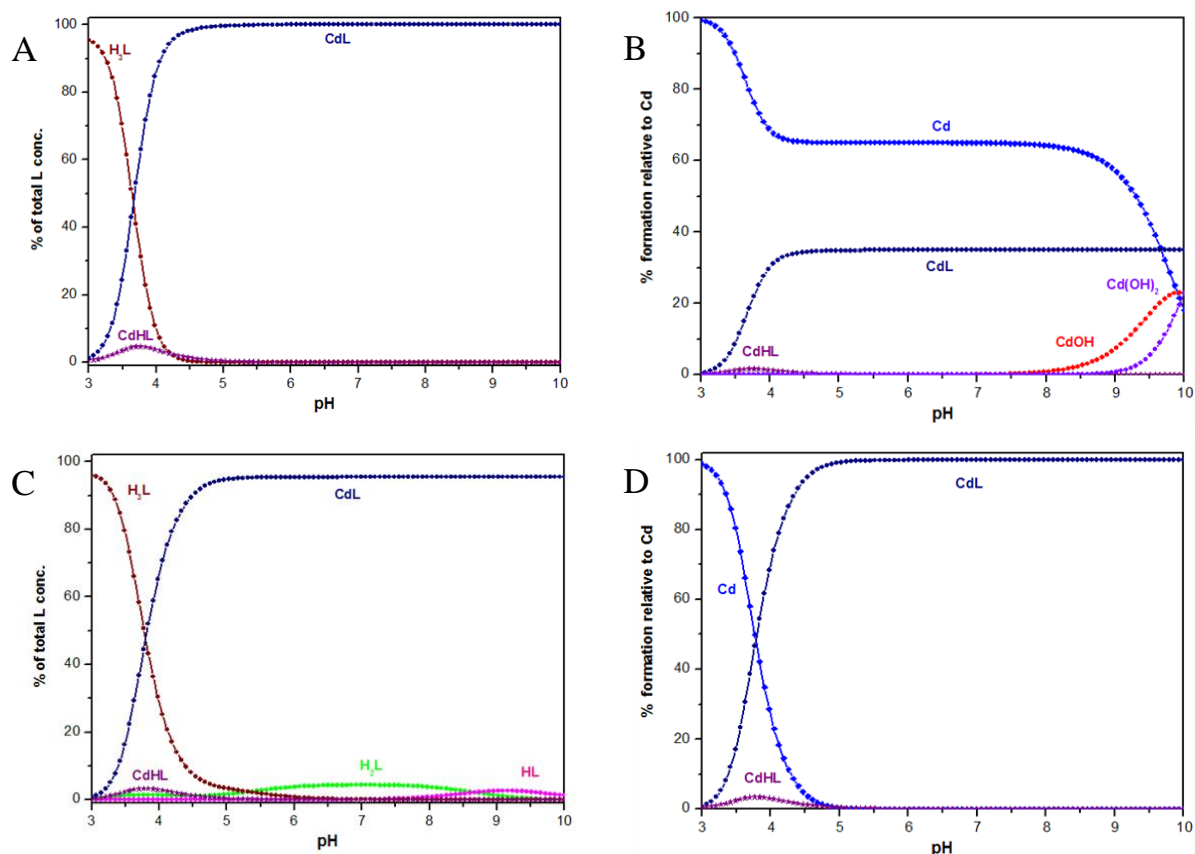
Como controlo positivo utilizou-se TBHP, um composto indutor de stress oxidativo que mimetiza o efeito dos ácidos gordos peroxidados, tendo um vasto uso como modelo de peroxidação lipídica [Fernandes *et al.*, 2010b]. Este controlo respondeu positivamente, levando a um aumento notório na intensidade de fluorescência (dados não apresentados).

No ensaio de DHR nenhum aumento de fluorescência foi observado após o tratamento de células MCF10A com CdCl<sub>2</sub> (até 200 μM, Figura 9A). Por outro lado, um ligeiro aumento nos níveis intracelulares de radical anião superóxido foi observado no ensaio de DHE (Figura 9B). Este aumento foi estatisticamente significativo para as concentrações de CdCl<sub>2</sub> de 100 μM (P<0,05) e 200 μM (P<0,01). Os nossos resultados apontam assim para uma contribuição de radical anião superóxido para os efeitos citotóxicos do Cd (II) em células MCF10A. No entanto, este envolvimento não parece ser muito pronunciado e é particularmente associado às concentrações mais elevadas Cd.

#### 4. Efeitos do sal de cálcio [15]pyN<sub>5</sub> na mitigação da citotoxicidade do Cd(II)

Tendo em conta os resultados acima referidos, as estratégias para neutralizar os efeitos tóxicos de Cd em células de mama devem utilizar sobretudo o desenvolvimento de novos agentes quelantes eficientes, em vez de abordagens baseadas em antioxidantes. Neste contexto, propusemos uma estratégia focada num agente quelante, mais concretamente um macrociclo pentaaza contendo piridina – 3,6,9,12,18-pentaazabicyclo[12.3.1]octadeca-1(18),14,16-triene ([15]pyN<sub>5</sub>). Os macrociclos têm sido amplamente estudados como agentes quelantes para aplicações médicas, uma vez que estes compostos podem proporcionar uma maior selectividade sobre iões metálicos essenciais e de menor toxicidade [Mewis e Archibald, 2010]. Além disso, os macrociclos geralmente formam complexos metálicos termodinamicamente mais estáveis do que aqueles formados a partir de ligandos análogos de cadeia aberta [Hancock e Martell, 1989; Mewis e Archibald, 2010]. Uma vez que os níveis de cálcio (Ca) podem influenciar os efeitos de Cd em sistemas biológicos [Sorensen *et al.*, 1984; Hinkle *et al.*, 1987; Zimmerhackl *et al.*, 1998], o nosso quelante foi preparado na forma de um sal de cálcio, o que pode melhorar a sua eficiência.

O macrociclo [15]pyN<sub>5</sub> foi sintetizado no nosso laboratório e os dados termodinâmicos publicados anteriormente [Fernandes *et al.*, 2011]. O [15]pyN<sub>5</sub> apresenta um valor elevado da constante de estabilidade de Cd(II) ( $\log K_{CdL} = 16,85$ ), enquanto a constante de Ca(II) tem um valor muito mais baixo ( $\log k_{CaL} = 3,21$ ). A distribuição das espécies está representada na Figura 10.



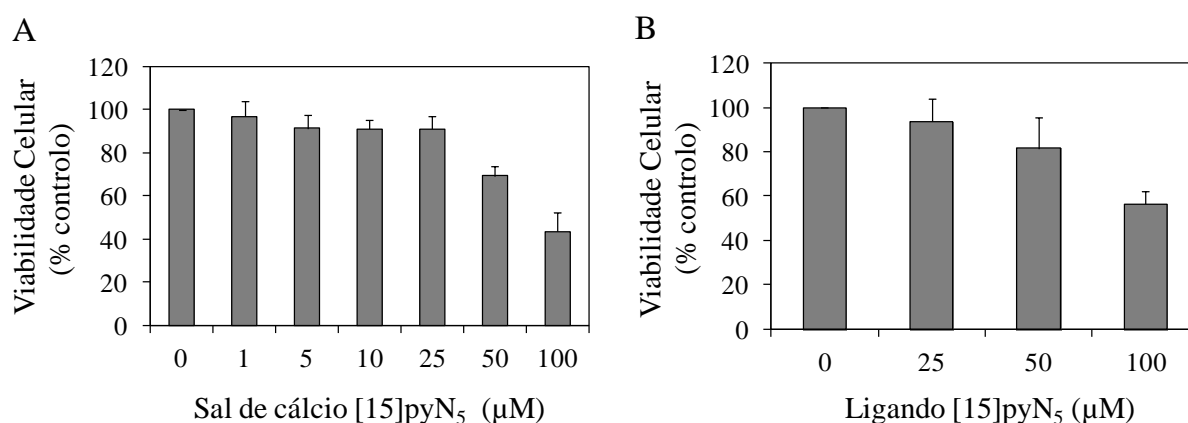
**Figura 10.** Curva de distribuição de espécies calculada pelo programa *HySS* para as soluções aquosas contendo Cd(II) e o sal de cálcio de [15]pyN<sub>5</sub>. (A e B ) Cd(II) 75  $\mu$ M e [15]pyN<sub>5</sub> 25  $\mu$ M; (C e D) Cd(II) 50  $\mu$ M e [15]pyN<sub>5</sub> 50  $\mu$ M.

Como se pode observar, o ligando possui elevada afinidade para a ligação ao Cd(II) numa estequiometria de 1:1. Em ambas as situações retratadas, quando o sal de cálcio de [15]pyN<sub>5</sub> é adicionado a uma solução aquosa de Cd(II), o ligando liga-se preferencialmente ao Cd, deixando o Ca(II) livre em solução. A pH fisiológico, em ambas as situações representadas na Figura 10, a totalidade de ligando encontra-se complexada com o Cd(II). No caso de concentrações equimolares de Cd e [15]pyN<sub>5</sub>, todo o Cd(II) está na forma de complexo, não se encontrando Cd(II) livre em solução.

Com base nessas características químicas, o macrociclo [15]pyN<sub>5</sub> parece ser um quelante adequado para o Cd, justificando assim estudos adicionais em modelos celulares *in vitro*.

#### 4.1. Efeito do agente macrocíclico [15]pyN<sub>5</sub> na viabilidade celular de células MCF10A

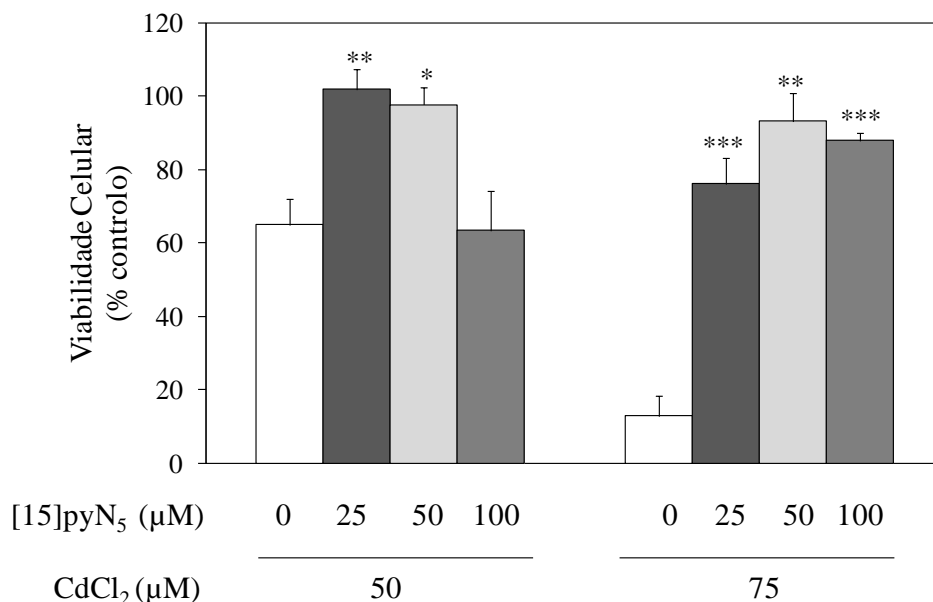
A citotoxicidade inerente do quelante em causa foi caracterizada em primeiro lugar. No nosso estudo, tanto [15]pyN<sub>5</sub> como o seu sal de cálcio, foram estudados em células MCF10A em termos de viabilidade celular, utilizando o ensaio de MTT (Figura 11). Ambos os agentes revelaram perfis de citotoxicidade comparáveis, sem efeitos tóxicos relevantes para concentrações até 25  $\mu$ M (24 horas de incubação). Para as concentrações mais elevadas de 50 e especialmente 100  $\mu$ M, foi observado um decréscimo considerável na viabilidade celular. Esta observação pode ser parcialmente atribuída à quelação de iões metálicos essenciais para funções celulares.



**Figura 11.** Viabilidade celular de células MCF10A tratadas com diferentes concentrações do sal de cálcio (A) e do ligando (B) de [15]pyN<sub>5</sub>, avaliada pelo ensaio de MTT. Os valores das viabilidades celulares (média  $\pm$  desvio padrão de duas a nove experiências independentes) são expressos como percentagens em relação às células controlo não tratadas.

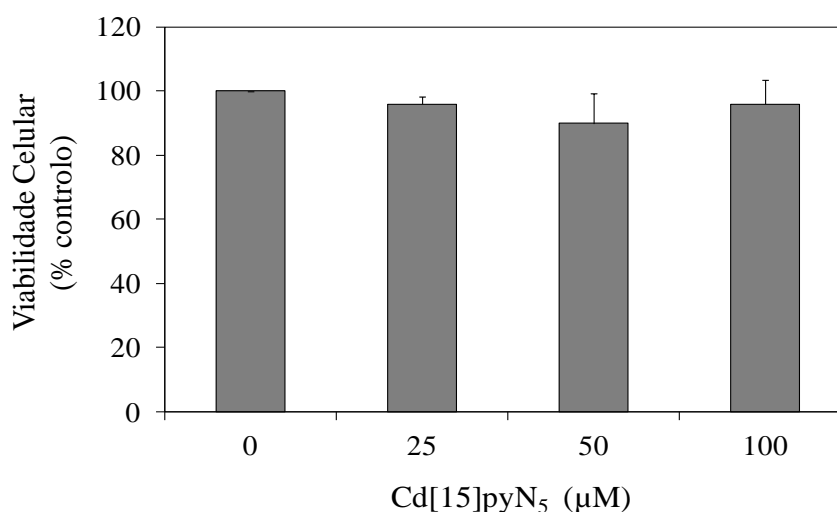
#### 4.2. Efeito do sal de cálcio de [15]pyN<sub>5</sub> na citotoxicidade do Cd(II)

A capacidade do sal de cálcio de [15]pyN<sub>5</sub> para contrariar o decréscimo da viabilidade celular induzido por Cd(II) utilizando o ensaio de MTT é apresentado na Figura 12. Nas concentrações de 25 e 50 µM foi observado uma protecção significativa face às concentrações de CdCl<sub>2</sub> (50 e 75 µM) sugerindo um efeito quelante eficiente. No que diz respeito à concentração de 100 µM do sal de cálcio [15]pyN<sub>5</sub> verificou-se um claro aumento da viabilidade celular em células tratadas com 75 µM de Cd(II), enquanto que nenhuma protecção foi observada face à concentração de 50 µM de Cd(II).



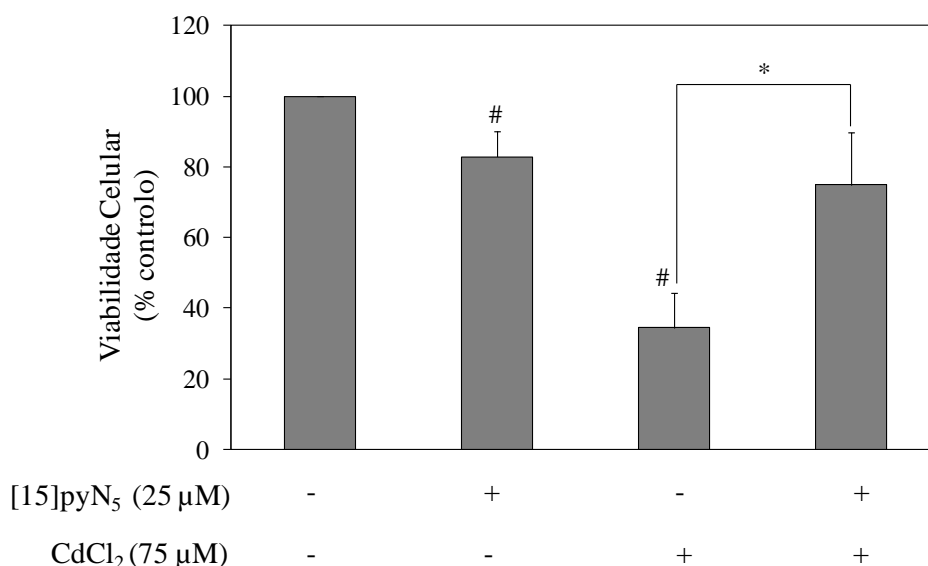
**Figura 12.** Efeito do sal de cálcio de [15]pyN<sub>5</sub> na citotoxicidade induzida por CdCl<sub>2</sub> (50 e 75 µM) em células MCF10A, (24 h, ensaio de MTT). Os valores das viabilidades celulares (média ± desvio padrão de pelo menos duas a dez experiências independentes) são expressos como percentagens em relação as células controlo não tratadas (\*P<0,05, \*\*P≤0,01 e \*\*\*P≤0,001 quando comparadas com as células tratadas apenas com CdCl<sub>2</sub>).

Estes efeitos diferenciais observados podem ser consequência de uma reacção estequiométrica entre o macrociclo e o Cd(II), sendo que o excesso marcado de Cd(II) ou de [15]pyN<sub>5</sub> apresenta toxicidade para as células. Em contrapartida, os resultados apontam para que o complexo de Cd formado após a reacção apresente muito pouca toxicidade para as células MCF10A. Para confirmar esta hipótese, foi delineada uma experiência de controlo usando o complexo Cd[15]pyN<sub>5</sub> (Figura 13) e nenhum efeito tóxico relevante foi observado até os 100 µM, usando o mesmo protocolo experimental.

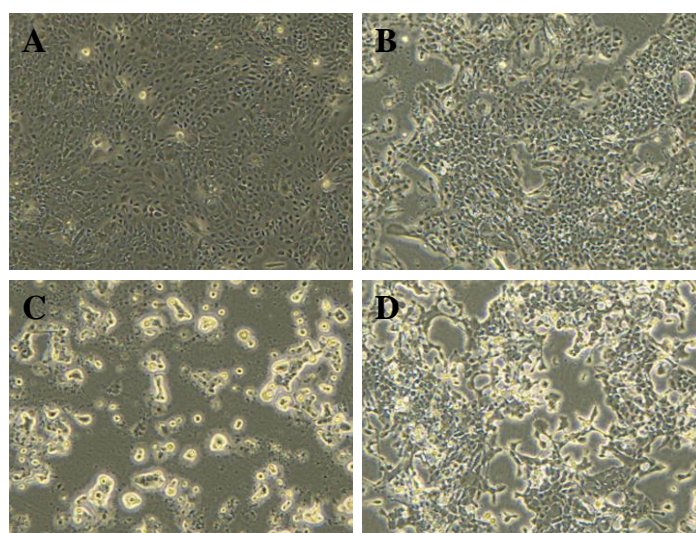


**Figura 13.** Viabilidade celular das células MCF10A tratadas com diferentes concentrações do complexo Cd[15]pyN<sub>5</sub>, avaliado pelo ensaio de MTT. Os valores das viabilidades celulares (média ± desvio padrão de duas experiências independentes) são expressos como percentagens em relação às células controlo não tratadas.

Com base nos resultados obtidos na Figura 12, foi observado um efeito protector notável para a concentração de 25 µM do sal de cálcio [15]pyN<sub>5</sub> face à concentração de 75 µM de CdCl<sub>2</sub>, conduzindo a um aumento da viabilidade celular de 12,9% para 76,2%. De forma a confirmar o efeito protector acima referido, sob as mesmas condições experimentais, foi utilizada uma outra metodologia para avaliar a viabilidade celular, o ensaio de CV. Os resultados obtidos com o ensaio de CV estão representados na Figura 14, e confirmaram a protecção significativa acima referida. Além disso, uma abordagem morfológica foi também usada, Figura 15, na qual o sal de cálcio de [15]pyN<sub>5</sub> melhorou a morfologia celular e o número de células MCF10A expostas ao CdCl<sub>2</sub> 75 µM.



**Figura 14.** Efeito do sal de cálcio de [15]pyN<sub>5</sub> na citotoxicidade induzida por 75 μM de CdCl<sub>2</sub> em células MCF10A (24 h, ensaio de Cristal Violeta). Os valores das viabilidades celulares (média ± desvio padrão de quatro experiências independentes) são expressas como percentagens em relação às células controlo não tratadas (<sup>#</sup>P<0,05, quando comparados com as células controlo não tratadas; <sup>\*</sup>P<0,05 quando comparadas com as células tratadas apenas com CdCl<sub>2</sub>).

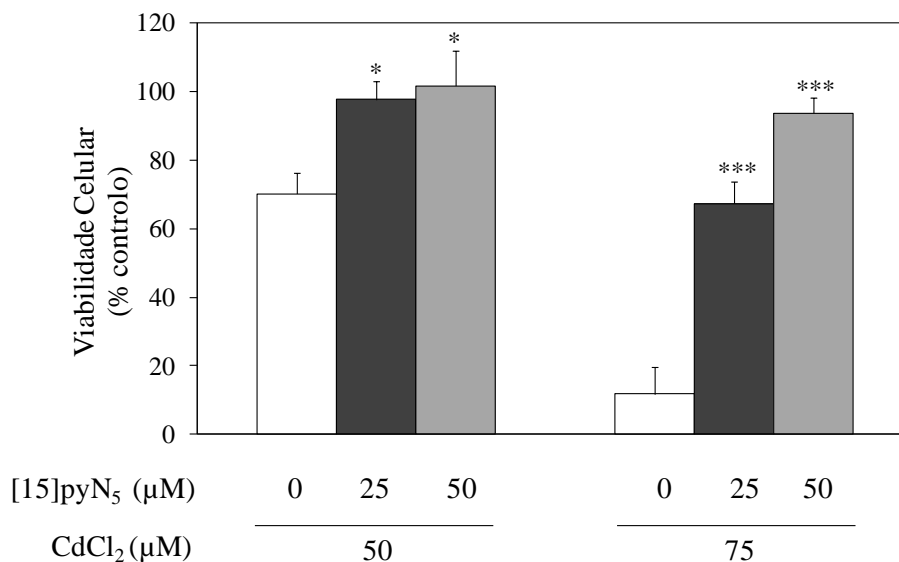


**Figura 15.** Morfologia de células MCF10A após diferentes tratamentos por 24 horas. A) células controlo não tratadas; B) sal de cálcio [15]pyN<sub>5</sub> 25 μM; C) CdCl<sub>2</sub> 75 μM; D) sal de cálcio [15]pyN<sub>5</sub> 25 μM + CdCl<sub>2</sub> 75 μM. As imagens representativas foram capturadas por uma câmara digital acoplada a um microscópio invertido de contraste de fase (ampliação de 40x).

#### 4.2.1. Efeito da acção quelante e da presença de $\text{Ca}^{2+}$ na reversão observada

O uso do sal de cálcio  $[15]\text{pyN}_5$  nos ensaios realizados conduz a um aumento dos níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  nas culturas celulares. Enquanto que a quelação de  $\text{Cd(II)}$  pelo ligando  $[15]\text{pyN}_5$  constitui o principal mecanismo responsável pelo decréscimo da toxicidade deste metal, a contribuição de iões  $\text{Ca}^{2+}$  na protecção global observada também deve ser considerada. Na verdade, o Cd e Ca possuem raios iónicos semelhantes sendo proposto que a permeação dos canais de Ca pelo Cd constitui um mecanismo de entrada de Cd em vários tecidos [Hinkle *et al.*, 1987; Thevenod, 2010]. Fenómenos competitivos entre os dois iões podem eventualmente ter efeitos em termos de viabilidade celular. Neste âmbito experiências adicionais foram realizadas de modo a avaliar a contribuição específica da protecção do ligando macrocíclico por si só (sem  $\text{Ca}^{2+}$ ) e dos iões  $\text{Ca}^{2+}$  na citotoxicidade de  $\text{Cd(II)}$  em células MCF10A.

No que se refere ao ligando  $[15]\text{pyN}_5$ , os resultados da Figura 16, estão de acordo com os obtidos para as experiências realizadas com o sal de cálcio de  $[15]\text{pyN}_5$  (Figura 12).

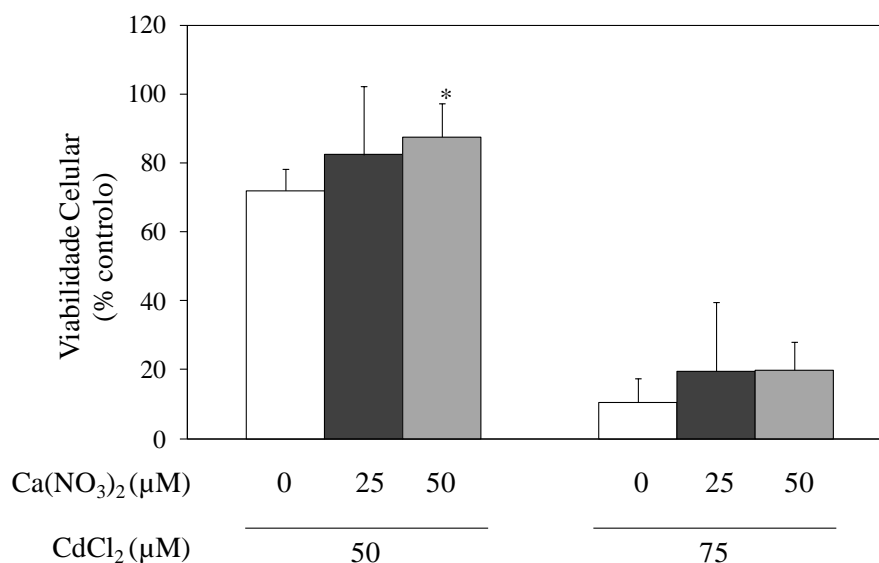


**Figura 16.** Efeito do ligando  $[15]\text{pyN}_5$  na citotoxicidade induzida por  $\text{CdCl}_2$  (50 e 75  $\mu\text{M}$ ) em células MCF10A (24h, ensaio de MTT). Os valores das viabilidade celulares (média  $\pm$  desvio padrão respectivo de pelo menos duas experiências independentes.) são expressos como percentagens em relação às células controlo não tratadas (\* $P < 0,05$  e \*\*\* $P \leq 0,001$  quando comparadas com as células tratadas apenas com  $\text{CdCl}_2$ ).



Notavelmente, uma protecção significativa marcada conferida por ambas as concentrações 25 e 50  $\mu\text{M}$  de ligando face à  $\text{Cd (II)}$  75  $\mu\text{M}$  foi observada, confirmando que a quelação é de facto o principal mecanismo de protecção envolvido.

O efeito da adição de  $\text{Ca}^{2+}$  às culturas celulares na citotoxicidade  $\text{Cd}$  está representado na Figura 17.



**Figura 17.** Efeito de  $\text{Ca(NO}_3)_2$  na citotoxicidade induzida por  $\text{CdCl}_2$  (50 e 75  $\mu\text{M}$ ) em células MCF10A (24h, ensaio de MTT). Os valores das viabilidades celulares (média  $\pm$  desvio padrão de pelo menos duas a quatro experiências independentes) são expressas como percentagens em relação às células controlo não tratadas (\* $P < 0,05$  quando comparadas com as células tratadas apenas com  $\text{CdCl}_2$ ).

É importante mencionar que o  $\text{Ca}^{2+}$  *per se* foi avaliado até à concentração de 50  $\mu\text{M}$  nas mesmas condições experimentais e nenhuma alteração foi verificada na viabilidade celular (dados não apresentados). A Figura 17, mostra um efeito ligeiro, mas significativo de  $\text{Ca}^{2+}$  (50  $\mu\text{M}$ ; sal nitrato,  $P < 0,05$ ) face à citotoxicidade de  $\text{CdCl}_2$  50  $\mu\text{M}$ , sugerindo um papel protector adicional de  $\text{Ca}^{2+}$  neste nível de concentração. No caso da concentração de  $\text{CdCl}_2$  75  $\mu\text{M}$ , o efeito de  $\text{Ca}^{2+}$  (25 e 50  $\mu\text{M}$ ) não foi significativo.

# **CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS**

A contaminação de alimentos com Cd e a consequente exposição humana a este metal tóxico tem vindo de forma gradual a ser uma fonte de preocupação para o Homem. De facto, metais pesados como o Cd conseguem penetrar na cadeia alimentar sujeitando assim as populações aos seus efeitos tóxicos a curto ou longo prazo. No que diz respeito à glândula mamária, embora nenhum estudo experimental em roedores tenha sido efectivamente capaz de provar que o Cd é um agente cancerígeno de mama, existem evidências de uma ligação entre a exposição a este metal e efeitos deletérios na glândula mamária.

No presente estudo, os resultados obtidos demonstraram que o Cd é nitidamente tóxico para as células mamárias humanas, MCF10A, diminuindo a sua viabilidade e proliferação celular de uma forma dependente da concentração. Foi observado igualmente um pequeno, mas significativo aumento da produção de radical anião superóxido, apontando assim para uma ligeira contribuição das ROS nos efeitos citotóxicos do Cd(II) observados nestas células. Os valores de IC<sub>50</sub> obtidos para as células MCF10A foram superiores aos descritos para várias linhas celulares humanas, para um período de 24 horas de incubação, sugerindo que estas células epiteliais mamárias humanas de origem não tumoral possam ser relativamente mais resistentes ou tolerantes aos efeitos deletérios do Cd.

Por outro lado, o uso de um agente macrocíclico, [15]pyN<sub>5</sub>, com características químicas e termodinâmicas apropriadas para a quelação do Cd, mostrou ser realmente eficaz na mitigação da citotoxicidade do Cd(II). Este agente quelante demonstrou ser bastante eficiente a contrariar o decréscimo da viabilidade celular e das alterações morfológicas induzidas pelo Cd. De facto, os resultados mostram que o efeito citotóxico do CdCl<sub>2</sub> pode ser efectivamente reduzido ou mesmo abolido por [15]pyN<sub>5</sub>, quer sob a forma de sal de cálcio ou sem Ca(II), sendo estes efeitos protectores em grande parte devido a um mecanismo baseado nas propriedades quelantes do macrociclo.

A quantidade crescente de dados experimentais e epidemiológicos que têm vindo a associar o Cd com diferentes efeitos nocivos na glândula mamária humana, podendo ter como consequência inclusivamente o aparecimento de cancro, justifica a necessidade de mais estudos adicionais de avaliação toxicológica, tanto a nível celular, como a nível molecular, em células epiteliais mamárias. Desta forma, propõe-se como perspectivas futuras deste trabalho, a realização de estudos subsequentes de forma a avaliar o potencial genotóxico do Cd em células MCF10A e a eficácia do agente quelante [15]pyN<sub>5</sub> na modulação dessa genotoxicidade, recorrendo a ensaios citogenéticos, como o ensaio de micronúcleo, o ensaio de aberrações cromossómicas ou o ensaio das trocas entre cromátides-irmãs. Estudos *in vivo*

(e.g. roedores) deverão ser igualmente efectuados de forma a avaliar o potencial protector deste composto face à toxicidade do Cd em diferentes órgãos e sistemas do animal, incluindo a mama.

A aplicação de modelos experimentais mais aproximados da situação *in vivo*, como é o caso das culturas de células MCF10A tridimensionais (3D), permitirá igualmente obter informação toxicológica adicional e a confirmação dos resultados obtidos nos modelos em monocamada (2D) aqui apresentados. Com o paralelismo de diversas metodologias complementares em sistemas de células MCF10A 3D e 2D, poderá ser possível o esclarecimento de mecanismos não só de citotoxicidade, como também de genotoxicidade do Cd no tecido mamário (e.g. ensaio do micronúcleo em células MCF10A com a citocinese bloqueada). Ensaio vocacionados para a avaliação da apoptose deverão ser igualmente efectuados em sistemas de monocamada (2D) e tridimensionais (3D), nomeadamente em termos de avaliação morfológica, activação de caspases e expressão de proteínas pró-apoptóticas e anti-apoptóticas.

Finalmente, este trabalho será também o ponto de partida para uma investigação racional e direccionada no âmbito da Química de coordenação. De facto, o agente quelante, [15]pyN<sub>5</sub>, poderá ser utilizado como um composto modelo (protótipo), ao qual serão efectuadas modificações químicas estruturais, no sentido de melhorar a sua eficácia, biodisponibilidade e eventual toxicidade.

# **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Adams SV, Newcomb P A, Shafer M M, Atkinson C, Bowles E J, Newton K M, Lampe J W. 2011. Urinary cadmium and mammographic density in premenopausal women. *Breast Cancer Res. Treat.* **128** 837-844.
- Afonso C, Lourenço H M, Dias A, Nunes M L, Castro M. 2007. Contaminant metals in black scabbard fish (*Aphanopus carbo*) caught off Madeira and the Azores. *Food Chemistry* **101** 120-125.
- Akesson A, Bjellerup P, Lundh T, Lidfeldt J, Nerbrand C, Samsioe G, Skerfving S, Vahter M. 2006. Cadmium-induced effects on bone in a population-based study of women. *Environ. Health Perspect.* **114** 830-834.
- Akesson A, Julin B, Wolk A. 2008. Long-term dietary cadmium intake and postmenopausal endometrial cancer incidence: a population-based prospective cohort study. *Cancer Res.* **68** 6435-6441.
- Akesson A, Lundh T, Vahter M, Bjellerup P, Lidfeldt J, Nerbrand C, Samsioe G, Stromberg U, Skerfving S. 2005. Tubular and glomerular kidney effects in Swedish women with low environmental cadmium exposure. *Environ. Health Perspect.* **113** 1627-1631.
- Al-Saleh I, Shinwari N, Mashhour A. 2003. Heavy metal concentrations in the breast milk of Saudi women. *Biol. Trace Elem. Res.* **96** 21-37.
- Alderighi L, Gans P, Lenco A, Peters D, Sabatini A, Vacca A. 1999. Hyperquad simulation and speciation (HySS): a utility program for the investigation of equilibria involving soluble and partially soluble species. *Coordination Chemistry Reviews* **184** 311-318.
- Ali I, Penttinen-Damdimopoulou P E, Makela S I, Berglund M, Stenius U, Akesson A, Hakansson H, Halldin K. 2010. Estrogen-like effects of cadmium in vivo do not appear to be mediated via the classical estrogen receptor transcriptional pathway. *Environ. Health Perspect.* **118** 1389-1394.
- Andersen O, Nielsen J B, Nordberg G F. 2004. Nutritional interactions in intestinal cadmium uptake--possibilities for risk reduction. *Biometals* **17** 543-547.
- Andujar P, Bensefa-Colas L, Descatha A. 2010. [Acute and chronic cadmium poisoning]. *Rev. Med. Interne* **31** 107-115.
- Antila E, Mussalo-Rauhamaa H, Kantola M, Atroshi F, Westermarck T. 1996. Association of cadmium with human breast cancer. *Sci. Total Environ.* **186** 251-256.
- ASAE. 2009. Perfil de risco dos principais alimentos consumidos em Portugal. Autoridade de Segurança Alimentar e Económica, Direcção de Avaliação e Comunicação dos Riscos. pp. 1-330
- ATSDR. 2008. Draft toxicological profile for cadmium. September 2008. Agency for Toxic Substance and Disease Registry. Atlanta, GA. pp 1-512. in: <http://www.atsdr.cdc.gov/>.
- Belyaeva EA, Dymkowska D, Wieckowski M R, Wojtczak L. 2006. Reactive oxygen species produced by the mitochondrial respiratory chain are involved in Cd<sup>2+</sup>-induced injury of rat ascites hepatoma AS-30D cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1757** 1568-1574.

- Belyaeva EA, Dymkowska D, Wieckowski M R, Wojtczak L. 2008. Mitochondria as an important target in heavy metal toxicity in rat hepatoma AS-30D cells. *Toxicol Appl. Pharmacol.* **231** 34-42.
- Benbrahim-Tallaa L, Tokar E J, Diwan B A, Dill A L, Coppin J F, Waalkes M P. 2009. Cadmium malignantly transforms normal human breast epithelial cells into a basal-like phenotype. *Environ. Health Perspect.* **117** 1847-1852.
- Bernard A. 2008. Cadmium & its adverse effects on human health. *Indian J. Med. Res.* **128** 557-564.
- Bertin G, Averbeck D. 2006. Cadmium: cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences (a review). *Biochimie* **88** 1549-1559.
- Beyersmann D, Hechtenberg S. 1997. Cadmium, gene regulation, and cellular signalling in mammalian cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **144** 247-261.
- Bopp SK, Lettieri T. 2008. Comparison of four different colorimetric and fluorometric cytotoxicity assays in a zebrafish liver cell line. *BMC. Pharmacol.* **8** 8.
- Brama M, Gnassi L, Basciani S, Cerulli N, Politi L, Spera G, Mariani S, Cherubini S, d'Abusco A S, Scandurra R, Migliaccio S. 2007. Cadmium induces mitogenic signaling in breast cancer cell by an ERalpha-dependent mechanism. *Mol. Cell Endocrinol.* **264** 102-108.
- Brzoska MM, Kaminski M, Supernak-Bobko D, Zwierz K, Moniuszko-Jakoniuk J. 2003. Changes in the structure and function of the kidney of rats chronically exposed to cadmium. I. Biochemical and histopathological studies. *Arch. Toxicol.* **77** 344-352.
- Brzoska MM, Moniuszko-Jakoniuk J. 2001. Interactions between cadmium and zinc in the organism. *Food Chem. Toxicol.* **39** 967-980.
- Cannino G, Ferruggia E, Luparello C, Rinaldi A M. 2009. Mitochondrial compartment: a possible target of cadmium effects on breast epithelial cells. *Mol. Cell Biochem.* **328** 75-84.
- Chater S, Douki T, Garrel C, Favier A, Sakly M, Abdelmelek H. 2008. Cadmium-induced oxidative stress and DNA damage in kidney of pregnant female rats. *C. R. Biol.* **331** 426-432.
- Chatterjee M, Dwivedi V K, Khandekar K, Tandon S K. 2004. Chelation in metal intoxication XLVI: synthesis of some alpha-mercapto-beta-substituted aryl acrylic acids and their in vitro cadmium chelating ability. *Biomed. Environ. Sci.* **17** 27-32.
- Chen YC, Pu Y S, Wu H C, Wu T T, Lai M K, Yang C Y, Sung F C. 2009. Cadmium burden and the risk and phenotype of prostate cancer. *BMC. Cancer* **9** 429.
- Chiba K, Kawakami K, Tohyama K. 1998. Simultaneous evaluation of cell viability by neutral red, MTT and crystal violet staining assays of the same cells. *Toxicol In Vitro* **12** 251-258.
- EFSA. 2009. Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain - Cadmium in food. *The EFSA Journal* **980** 1-139.

- Elinder CG, Kjellstrom T, Hogstedt C, Andersson K, Spang G. 1985. Cancer mortality of cadmium workers. *Br. J. Ind. Med.* **42** 651-655.
- EPA. 1999. Cadmium and Cadmium Compounds - Toxicological Review. USA Environmental Protection Agency, Washington D.C.
- FAO/WHO. 2011. Safety evaluation of certain food additive and contaminants in food. In Prepared by the Seventy-third meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). Geneva. pp 1-226.
- Fernandes AS, Cabral M F, Costa J, Castro M, Delgado R, Drew M G, Felix V. 2011. Two macrocyclic pentaaza compounds containing pyridine evaluated as novel chelating agents in copper(II) and nickel(II) overload. *J. Inorg. Biochem.* **105** 292-301.
- Fernandes AS, Caneiras C, Oliveira N G, Costa J, Cabral F, Castro M. 2007a. Cádmio: Fontes de Exposição e Efeitos Tóxicos para o Homem. in: <http://www.asae.pt/>.
- Fernandes AS, Gaspar J, Cabral M F, Caneiras C, Guedes R, Rueff J, Castro M, Costa J, Oliveira N G. 2007b. Macrocyclic copper(II) complexes: superoxide scavenging activity, structural studies and cytotoxicity evaluation. *J. Inorg. Biochem.* **101** 849-858.
- Fernandes AS, Gaspar J, Cabral M F, Rueff J, Castro M, Batinic-Haberle I, Costa J, Oliveira N G. 2010a. Protective role of ortho-substituted Mn(III) N-alkylpyridylporphyrins against the oxidative injury induced by tert-butylhydroperoxide. *Free Radic. Res.* **44** 430-440.
- Fernandes AS, Serejo J, Gaspar J, Cabral F, Bettencourt A F, Rueff J, Castro M, Costa J, Oliveira N G. 2010b. Oxidative injury in V79 Chinese hamster cells: protective role of the superoxide dismutase mimetic MnTM-4-PyP. *Cell Biol. Toxicol.* **26** 91-101.
- Figueroa BE. 2008. Are more restrictive food cadmium standards justifiable health safety measures or opportunistic barriers to trade? An answer from economics and public health. *Sci. Total Environ.* **389** 1-9.
- Flora SJ, Pachauri V. 2010. Chelation in metal intoxication. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **7** 2745-2788.
- Gallagher CM, Chen J J, Kovach J S. 2010. Environmental cadmium and breast cancer risk. *Aging (Albany. NY)* **2** 804-814.
- Garcia-Esquinas E, Perez-Gomez B, Fernandez M A, Perez-Meixeira A M, Gil E, Paz C D, Iriso A, Sanz J C, Astray J, Cisneros M, Santos A D, Asensio A, Garcia-Sagredo J M, Garcia J F, Vioque J, Pollan M, Lopez-Abente G, Gonzalez M J, Martinez M, Bohigas P A, Pastor R, Aragonés N. 2011. Mercury, lead and cadmium in human milk in relation to diet, lifestyle habits and sociodemographic variables in Madrid (Spain). *Chemosphere* **85** 268-276.
- Garcia-Morales P, Saceda M, Kenney N, Kim N, Salomon D S, Gottardis M M, Solomon H B, Sholler P F, Jordan V C, Martin M B. 1994. Effect of cadmium on estrogen receptor levels and estrogen-induced responses in human breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* **269** 16896-16901.



- Gil F, Hernandez A F, Marquez C, Femia P, Olmedo P, Lopez-Guarnido O, Pla A. 2011. Biomonitorization of cadmium, chromium, manganese, nickel and lead in whole blood, urine, axillary hair and saliva in an occupationally exposed population. *Sci. Total Environ.* **409** 1172-1180.
- Godt J, Scheidig F, Grosse-Siestrup C, Esche V, Brandenburg P, Reich A, Groneberg D A. 2006. The toxicity of cadmium and resulting hazards for human health. *J. Occup. Med. Toxicol.* **10** 1-22.
- Gomes A, Fernandes E, Lima J L. 2005. Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *J. Biochem. Biophys. Methods* **65** 45-80.
- Grawe KP, Pickova J, Dutta P C, Oskarsson A. 2004. Fatty acid alterations in liver and milk of cadmium exposed rats and in brain of their suckling offspring. *Toxicol. Lett.* **148** 73-82.
- Hancock RD, Martell A E. 1989. Ligand Design for Selective Complexation of Metal Ions in Aqueous Solution. *Chem. Rev.* **89** 1875-1914.
- Haouem S, Hmad N, Najjar M F, El H A, Sakly R. 2007. Accumulation of cadmium and its effects on liver and kidney functions in rats given diet containing cadmium-polluted radish bulb. *Exp. Toxicol. Pathol.* **59** 77-80.
- Hartwig A. 2010. Mechanisms in cadmium-induced carcinogenicity: recent insights. *Biometals* **23** 951-960.
- Hartwig A, Schwerdtle T. 2002. Interactions by carcinogenic metal compounds with DNA repair processes: toxicological implications. *Toxicol. Lett.* **127** 47-54.
- Haswell-Elkins M, Satarug S, O'Rourke P, Moore M, Ng J, McGrath V, Walmby M. 2008. Striking association between urinary cadmium level and albuminuria among Torres Strait Islander people with diabetes. *Environ. Res.* **106** 379-383.
- Heilier JF, Donnez J, Verougstraete V, Donnez O, Grandjean F, Haufroid V, Nackers F, Lison D. 2006. Cadmium, lead and endometriosis. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* **80** 149-153.
- Hinkle PM, Kinsella P A, Osterhoudt K C. 1987. Cadmium uptake and toxicity via voltage-sensitive calcium channels. *J. Biol. Chem.* **262** 16333-16337.
- Hogervorst J, Plusquin M, Vangronsveld J, Nawrot T, Cuypers A, Van H E, Roels H A, Carleer R, Staessen J A. 2007. House dust as possible route of environmental exposure to cadmium and lead in the adult general population. *Environ. Res.* **103** 30-37.
- Honda R, Tawara K, Nishijo M, Nakagawa H, Tanebe K, Saito S. 2003. Cadmium exposure and trace elements in human breast milk. *Toxicology* **186** 255-259.
- Hu J, Mao Y, White K. 2002. Renal cell carcinoma and occupational exposure to chemicals in Canada. *Occup. Med. (Lond)* **52** 157-164.
- Huff J, Lunn R M, Waalkes M P, Tomatis L, Infante P F. 2007. Cadmium-induced cancers in animals and in humans. *Int. J. Occup. Environ. Health* **13** 202-212.

- Inaba T, Kobayashi E, Suwazono Y, Uetani M, Oishi M, Nakagawa H, Nogawa K. 2005. Estimation of cumulative cadmium intake causing Itai-itai disease. *Toxicol. Lett.* **159** 192-201.
- International Agency for Research on Cancer (IARC). 1993. Meeting of the IARC working group on beryllium, cadmium, mercury and exposures in the glass manufacturing industry. *Scand. J. Work Environ. Health* **19** 360-363. in: <http://monographs.iarc.fr/>.
- Itoh H, Iwasaki M, Nakajima Y, Endo Y, Hanaoka T, Sasaki H, Tanaka T, Yang B, Tsugane S. 2008. A case-control study of the association between urinary cadmium concentration and endometriosis in infertile Japanese women. *Sci. Total Environ.* **402** 171-175.
- Jackson LW, Zullo M D, Goldberg J M. 2008. The association between heavy metals, endometriosis and uterine myomas among premenopausal women: National Health and Nutrition Examination Survey 1999-2002. *Hum. Reprod.* **23** 679-687.
- Jarup L. 2002. Cadmium overload and toxicity. *Nephrol. Dial. Transplant.* **17 Suppl 2** 35-39.
- Jarup L, Akesson A. 2009. Current status of cadmium as an environmental health problem. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **238** 201-208.
- Jarup L, Berglund M, Elinder C G, Nordberg G, Vahter M. 1998. Health effects of cadmium exposure--a review of the literature and a risk estimate. *Scand. J. Work Environ. Health* **24 Suppl 1** 1-51.
- Johnson MD, Kenney N, Stoica A, Hilakivi-Clarke L, Singh B, Chepko G, Clarke R, Sholler P F, Lirio A A, Foss C, Reiter R, Trock B, Paik S, Martin M B. 2003. Cadmium mimics the in vivo effects of estrogen in the uterus and mammary gland. *Nat. Med.* **9** 1081-1084.
- Johri N, Jacquillet G, Unwin R. 2010. Heavy metal poisoning: the effects of cadmium on the kidney. *Biometals* **23** 783-792.
- Joseph P. 2009. Mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **238** 272-279.
- Joseph P, Muchnok T K, Klishis M L, Roberts J R, Antonini J M, Whong W Z, Ong T. 2001. Cadmium-induced cell transformation and tumorigenesis are associated with transcriptional activation of c-fos, c-jun, and c-myc proto-oncogenes: role of cellular calcium and reactive oxygen species. *Toxicol Sci.* **61** 295-303.
- Julin B, Wolk A, Akesson A. 2011. Dietary cadmium exposure and risk of epithelial ovarian cancer in a prospective cohort of Swedish women. *Br. J. Cancer* **105** 441-444.
- Kazantzis G. 2004. Cadmium, osteoporosis and calcium metabolism. *Biometals* **17** 493-498.
- Kazantzis G, Lam T H, Sullivan K R. 1988. Mortality of cadmium-exposed workers. A five-year update. *Scand. J. Work Environ. Health* **14** 220-223.
- Kellen E, Zeegers M P, Hond E D, Buntinx F. 2007. Blood cadmium may be associated with bladder carcinogenesis: the Belgian case-control study on bladder cancer. *Cancer Detect. Prev.* **31** 77-82.

- Kim M, Kim K. 2011. Biomonitoring of lead and cadmium in the hair and fingernails of elderly korean subjects. *Biol. Trace Elem. Res.* **143** 794-802.
- Kippler M, Hoque A M, Raqib R, Ohrvik H, Ekstrom E C, Vahter M. 2010. Accumulation of cadmium in human placenta interacts with the transport of micronutrients to the fetus. *Toxicol. Lett.* **192** 162-168.
- Kippler M, Lonnerdal B, Goessler W, Ekstrom E C, Arifeen S E, Vahter M. 2009. Cadmium interacts with the transport of essential micronutrients in the mammary gland - a study in rural Bangladeshi women. *Toxicology* **257** 64-69.
- Klaassen CD. 2008. *Casarett & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons*. McGraw-Hill, Seventh Edition.
- Klaassen CD, Liu J, Choudhuri S. 1999. Metallothionein: an intracellular protein to protect against cadmium toxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **39** 267-294.
- Klaassen CD, Liu J, Diwan B A. 2009. Metallothionein protection of cadmium toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **238** 215-220.
- Koyu A, Gokcimen A, Ozguner F, Bayram D S, Kocak A. 2006. Evaluation of the effects of cadmium on rat liver. *Mol. Cell Biochem.* **284** 81-85.
- Kriegel AM, Soliman A S, Zhang Q, El-Ghawalby N, Ezzat F, Soultan A, Abdel-Wahab M, Fathy O, Ebidi G, Bassiouni N, Hamilton S R, Abbruzzese J L, Lacey M R, Blake D A. 2006. Serum cadmium levels in pancreatic cancer patients from the East Nile Delta region of Egypt. *Environ. Health Perspect.* **114** 113-119.
- Lawal AO, Ellis E. 2010. Differential sensitivity and responsiveness of three human cell lines HepG2, 1321N1 and HEK 293 to cadmium. *J. Toxicol Sci.* **35** 465-478.
- Lemen RA, Lee J S, Wagoner J K, Blejer H P. 1976. Cancer mortality among cadmium production workers. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **271** 273-279.
- Liu J, Qu W, Kadiiska M B. 2009. Role of oxidative stress in cadmium toxicity and carcinogenesis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **238** 209-214.
- Liu Z, Yu X, Shaikh Z A. 2008. Rapid activation of ERK1/2 and AKT in human breast cancer cells by cadmium. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **228** 286-294.
- Lopez E, Arce C, Oset-Gasque M J, Canadas S, Gonzalez M P. 2006. Cadmium induces reactive oxygen species generation and lipid peroxidation in cortical neurons in culture. *Free Radic. Biol. Med.* **40** 940-951.
- Mannetje A, Bencko V, Brennan P, Zaridze D, Szeszenia-Dabrowska N, Rudnai P, Lissowska J, Fabianova E, Cassidy A, Mates D, Foretova L, Janout V, Fevotte J, Fletcher T, Boffetta P. 2011. Occupational exposure to metal compounds and lung cancer. Results from a multi-center case-control study in Central/Eastern Europe and UK. *Cancer Causes Control* **22** 1669-1680.

- Martin LJ, Boyd N F. 2008. Mammographic density. Potential mechanisms of breast cancer risk associated with mammographic density: hypotheses based on epidemiological evidence. *Breast Cancer Res.* **10** 201.
- Martins CT, Mercês A, Alvito P. 2009. Ocorrência de cádmio em produtos à base de cereais, de origem convencional e biológica, destinados à alimentação infantil. *Saúde e Tecnologia* **3** 10-14.
- Matovic V, Buha A, Bulat Z, Dukic-Cosic D. 2011. Cadmium toxicity revisited: focus on oxidative stress induction and interactions with zinc and magnesium. *Arh. Hig. Rada Toksikol.* **62** 65-76.
- McElroy JA, Shafer M M, Trentham-Dietz A, Hampton J M, Newcomb P A. 2006. Cadmium exposure and breast cancer risk. *J. Natl. Cancer Inst.* **98** 869-873.
- Mei J, Hu H, McEntee M, Plummer H, III, Song P, Wang H C. 2003. Transformation of non-cancerous human breast epithelial cell line MCF10A by the tobacco-specific carcinogen NNK. *Breast Cancer Res. Treat.* **79** 95-105.
- Menke A, Muntner P, Silbergeld E K, Platz E A, Guallar E. 2009. Cadmium levels in urine and mortality among U.S. adults. *Environ. Health Perspect.* **117** 190-196.
- Meplan C, Mann K, Hainaut P. 1999. Cadmium induces conformational modifications of wild-type p53 and suppresses p53 response to DNA damage in cultured cells. *J. Biol. Chem.* **274** 31663-31670.
- Mewis RE, Archibald S J. 2010. Biomedical applications of macrocyclic ligand complexes. *Coordination Chemistry Reviews* **254** 1686-1712.
- Mickuviene I, Kirveliëne V, Juodka B. 2004. Experimental survey of non-clonogenic viability assays for adherent cells in vitro. *Toxicol In Vitro* **18** 639-648.
- Milnerowicz H, Chmarek M. 2005. Influence of smoking on metallothionein level and other proteins binding essential metals in human milk. *Acta Paediatr.* **94** 402-406.
- Moulis JM. 2010. Cellular mechanisms of cadmium toxicity related to the homeostasis of essential metals. *Biometals* **23** 877-896.
- Moulis JM, Thevenod F. 2010. New perspectives in cadmium toxicity: an introduction. *Biometals* **23** 763-768.
- Narayan S, Jaiswal A S, Kang D, Srivastava P, Das G M, Gairola C G. 2004. Cigarette smoke condensate-induced transformation of normal human breast epithelial cells in vitro. *Oncogene* **23** 5880-5889.
- National Toxicology Program (NTP). 2011. Cadmium and cadmium compounds - Report on Carcinogens. *Natl Toxicol Program Tech Rep Ser.* **12** 80-83. in: <http://ntp.niehs.nih.gov/>.
- Nawrot T, Plusquin M, Hogervorst J, Roels H A, Celis H, Thijs L, Vangronsveld J, Van H E, Staessen J A. 2006. Environmental exposure to cadmium and risk of cancer: a prospective population-based study. *Lancet Oncol.* **7** 119-126.

- Nawrot TS, Staessen J A, Roels H A, Munters E, Cuypers A, Richart T, Ruttens A, Smeets K, Clijsters H, Vangronsveld J. 2010. Cadmium exposure in the population: from health risks to strategies of prevention. *Biometals* **23** 769-782.
- Nawrot TS, Van H E, Thijs L, Richart T, Kuznetsova T, Jin Y, Vangronsveld J, Roels H A, Staessen J A. 2008. Cadmium-related mortality and long-term secular trends in the cadmium body burden of an environmentally exposed population. *Environ. Health Perspect.* **116** 1620-1628.
- Nishijo M, Nakagawa H, Honda R, Tanebe K, Saito S, Teranishi H, Tawara K. 2002. Effects of maternal exposure to cadmium on pregnancy outcome and breast milk. *Occup. Environ. Med.* **59** 394-396.
- Nordberg GF. 2009. Historical perspectives on cadmium toxicology. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **238** 192-200.
- Nzengue Y, Steiman R, Garrel C, Lefebvre E, Guiraud P. 2008. Oxidative stress and DNA damage induced by cadmium in the human keratinocyte HaCaT cell line: role of glutathione in the resistance to cadmium. *Toxicology* **243** 193-206.
- Ohrvik H. 2010. Cadmium in the Mammary Gland and Neonatal Intestine - Transport Pathways and Interactions with Calcium and Iron. In Faculty of Veterinary Medicine and Animal Sciences - Department of Biomedical Sciences and Veterinary Public Health, Uppsala: Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala; pp 1-78.
- Ohrvik H, Ulleras E, Oskarsson A, Tallkvist J. 2011. Effects of cadmium on calcium transporter SPCA, calcium homeostasis and beta-casein expression in the murine mammary epithelium. *Toxicol. Lett.* **201** 80-85.
- Ohrvik H, Yoshioka M, Oskarsson A, Tallkvist J. 2006. Cadmium-induced disturbances in lactating mammary glands of mice. *Toxicol. Lett.* **164** 207-213.
- Okuda B, Iwamoto Y, Tachibana H, Sugita M. 1997. Parkinsonism after acute cadmium poisoning. *Clin. Neurol. Neurosurg.* **99** 263-265.
- Oliveira NG, Pingarilho M, Martins C, Fernandes A S, Vaz S, Martins V, Rueff J, Gaspar J F. 2009. Cytotoxicity and chromosomal aberrations induced by acrylamide in V79 cells: role of glutathione modulators. *Mutat. Res.* **676** 87-92.
- Olsson IM, Bensryd I, Lundh T, Ottosson H, Skerfving S, Oskarsson A. 2002. Cadmium in blood and urine--impact of sex, age, dietary intake, iron status, and former smoking--association of renal effects. *Environ. Health Perspect.* **110** 1185-1190.
- Orun E, Yalcin S S, Aykut O, Orhan G, Morgil G K, Yurdakok K, Uzun R. 2011. Breast milk lead and cadmium levels from suburban areas of Ankara. *Sci. Total Environ.* **409** 2467-2472.
- Oskarsson A, Widell A, Olsson I M, Grawe K P. 2004. Cadmium in food chain and health effects in sensitive population groups. *Biometals* **17** 531-534.
- Pan J, Plant J A, Voulvoulis N, Oates C J, Ihlenfeld C. 2010. Cadmium levels in Europe: implications for human health. *Environ. Geochem. Health* **32** 1-12.

- Pesch B, Haerting J, Ranft U, Klimpel A, Oelschlagel B, Schill W. 2000. Occupational risk factors for renal cell carcinoma: agent-specific results from a case-control study in Germany. MURC Study Group. Multicenter urothelial and renal cancer study. *Int. J. Epidemiol.* **29** 1014-1024.
- Peshavariya HM, Dusting G J, Selemidis S. 2007. Analysis of dihydroethidium fluorescence for the detection of intracellular and extracellular superoxide produced by NADPH oxidase. *Free Radic. Res.* **41** 699-712.
- Petersson GK, Oskarsson A. 2000. Cadmium in milk and mammary gland in rats and mice. *Arch. Toxicol.* **73** 519-527.
- Pias EK, Ekshyyan O Y, Rhoads C A, Fuseler J, Harrison L, Aw T Y. 2003. Differential effects of superoxide dismutase isoform expression on hydroperoxide-induced apoptosis in PC-12 cells. *J. Biol. Chem.* **278** 13294-13301.
- Poças MF, Hogg T. 2007. Exposure assessment of chemicals from packaging materials in foods: a review. *Food Science and Tecnology* **18** 219-230.
- Pourahmad J, O'Brien P J. 2000. A comparison of hepatocyte cytotoxic mechanisms for Cu<sup>2+</sup> and Cd<sup>2+</sup>. *Toxicology* **143** 263-273.
- Qu W, Diwan B A, Reece J M, Bortner C D, Pi J, Liu J, Waalkes M P. 2005. Cadmium-induced malignant transformation in rat liver cells: role of aberrant oncogene expression and minimal role of oxidative stress. *Int. J. Cancer* **114** 346-355.
- Ramachandran C, You W. 1999. Differential sensitivity of human mammary epithelial and breast carcinoma cell lines to curcumin. *Breast Cancer Res. Treat.* **54** 269-278.
- Rubio C, Hardisson A, Reguera J I, Revert C, Lafuente M A, Gonzalez-Iglesias T. 2006. Cadmium dietary intake in the Canary Islands, Spain. *Environ. Res.* **100** 123-129.
- Sabolic I, Breljak D, Skarica M, Herak-Kramberger C M. 2010. Role of metallothionein in cadmium traffic and toxicity in kidneys and other mammalian organs. *Biometals* **23** 897-926.
- Satoh M, Koyama H, Kaji T, Kito H, Tohyama C. 2002. Perspectives on cadmium toxicity research. *Tohoku J. Exp. Med.* **196** 23-32.
- Schwarzenbach G, Flaschka H A. 1969. *Complexometric titrations*. Methuen and Co: London.
- Shih CM, Ko W C, Wu J S, Wei Y H, Wang L F, Chang E E, Lo T Y, Cheng H H, Chen C T. 2004. Mediating of caspase-independent apoptosis by cadmium through the mitochondria-ROS pathway in MRC-5 fibroblasts. *J. Cell Biochem.* **91** 384-397.
- Silva E, Lopez-Espinosa M J, Molina-Molina J M, Fernandez M, Olea N, Kortenkamp A. 2006. Lack of activity of cadmium in in vitro estrogenicity assays. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **216** 20-28.
- Silvera SAN, Rohan T E. 2007. Trace elements and cancer risk: a review of the epidemiologic evidence. *Cancer Causes Control* **18** 7-27.

- Sorahan T. 1987. Mortality from lung cancer among a cohort of nickel cadmium battery workers: 1946-84. *Br. J. Ind. Med.* **44** 803-809.
- Sorahan T, Lister A, Gilthorpe M S, Harrington J M. 1995. Mortality of copper cadmium alloy workers with special reference to lung cancer and non-malignant diseases of the respiratory system, 1946-92. *Occup. Environ. Med.* **52** 804-812.
- Sorahan T, Waterhouse J A. 1983. Mortality study of nickel-cadmium battery workers by the method of regression models in life tables. *Br. J. Ind. Med.* **40** 293-300.
- Sorensen EM, Smith N K, Boecker C S, Acosta D. 1984. Calcium amelioration of cadmium-induced cytotoxicity in cultured rat hepatocytes. *In Vitro* **20** 771-779.
- Soule HD, Maloney T M, Wolman S R, Peterson W D, Jr., Brenz R, McGrath C M, Russo J, Pauley R J, Jones R F, Brooks S C. 1990. Isolation and characterization of a spontaneously immortalized human breast epithelial cell line, MCF-10. *Cancer Res.* **50** 6075-6086.
- Stayner L, Smith R, Thun M, Schnorr T, Lemen R. 1992. A dose-response analysis and quantitative assessment of lung cancer risk and occupational cadmium exposure. *Ann. Epidemiol.* **2** 177-194.
- Stoica A, Katzenellenbogen B S, Martin M B. 2000. Activation of estrogen receptor-alpha by the heavy metal cadmium. *Mol. Endocrinol.* **14** 545-553.
- Strumylaite L, Bogusevicius A, Abdrachmanovas O, Baranauskiene D, Kregzdyte R, Pranys D, Poskiene L. 2011. Cadmium concentration in biological media of breast cancer patients. *Breast Cancer Res. Treat.* **125** 511-517.
- Strumylaite L, Mechosina K, Tamasauskas S. 2010. Environmental factors and breast cancer. *Medicina (Kaunas)* **46** 867-873.
- Tait L, Soule H D, Russo J. 1990. Ultrastructural and immunocytochemical characterization of an immortalized human breast epithelial cell line, MCF-10. *Cancer Res.* **50** 6087-6094.
- Tandon SK, Prasad S, Singh S. 2000. Chelation in metal intoxication. XLIV: Efficacy of alpha-mercapto-beta-(5-substituted, 2-furyl) acrylic acids in mobilizing intracellularly bound cadmium in rat. *Biomed. Environ. Sci.* **13** 205-212.
- Tandon SK, Singh S, Prasad S, Khandekar K, Dwivedi V K, Chatterjee M, Mathur N. 2003. Reversal of cadmium induced oxidative stress by chelating agent, antioxidant or their combination in rat. *Toxicol. Lett.* **145** 211-217.
- Templeton DM, Liu Y. 2010. Multiple roles of cadmium in cell death and survival. *Chem. Biol. Interact.* **188** 267-275.
- Thevenod F. 2010. Catch me if you can! Novel aspects of cadmium transport in mammalian cells. *Biomaterials* **23** 857-875.
- Thompson J, Bannigan J. 2008. Cadmium: toxic effects on the reproductive system and the embryo. *Reprod. Toxicol.* **25** 304-315.

- Tian LL, Zhao Y C, Wang X C, Gu J L, Sun Z J, Zhang Y L, Wang J X. 2009. Effects of gestational cadmium exposure on pregnancy outcome and development in the offspring at age 4.5 years. *Biol. Trace Elem. Res.* **132** 51-59.
- Turconi G, Guarcello M, Livieri C, Comizzoli S, Maccarini L, Castellazzi A M, Pietri A, Piva G, Roggi C. 2004. Evaluation of xenobiotics in human milk and ingestion by the newborn--an epidemiological survey in Lombardy (Northern Italy). *Eur. J. Nutr.* **43** 191-197.
- van Duursen MB, Sanderson J T, van der Bruggen M, van der Linden J, van den Berg M. 2003. Effects of several dioxin-like compounds on estrogen metabolism in the malignant MCF-7 and nontumorigenic MCF-10A human mammary epithelial cell lines. *Toxicol Appl. Pharmacol.* **190** 241-250.
- Vromman V, Saegerman C, Pussemier L, Huyghebaert A, De T L, Pizzolon J C, Waegeneers N. 2008. Cadmium in the food chain near non-ferrous metal production sites. *Food Addit. Contam Part A Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.* **25** 293-301.
- Waalkes MP. 2000. Cadmium carcinogenesis in review. *J. Inorg. Biochem.* **79** 241-244.
- Waalkes MP. 2003. Cadmium carcinogenesis. *Mutat. Res.* **533** 107-120.
- Wagner GJ, Yeargan R. 1986. Variation in cadmium accumulation potential and tissue distribution of cadmium in tobacco. *Plant Physiol* **82** 274-279.
- Waisberg M, Joseph P, Hale B, Beyersmann D. 2003. Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicology* **192** 95-117.
- Wardman P. 2007. Fluorescent and luminescent probes for measurement of oxidative and nitrosative species in cells and tissues: progress, pitfalls, and prospects. *Free Radic. Biol. Med.* **43** 995-1022.
- Watjen W, Beyersmann D. 2004. Cadmium-induced apoptosis in C6 glioma cells: influence of oxidative stress. *Biometals* **17** 65-78.
- Watjen W, Cox M, Biagioli M, Beyersmann D. 2002. Cadmium-induced apoptosis in C6 glioma cells: mediation by caspase 9-activation. *Biometals* **15** 15-25.
- West DW, Slaterry M L, Robison L M, French T K, Mahoney A W. 1991. Adult dietary intake and prostate cancer risk in Utah: a case-control study with special emphasis on aggressive tumors. *Cancer Causes Control* **2** 85-94.
- WHO. 2010. Exposure to Cadmium: A major public health concern. World Health Organization, Geneva.
- WHO/FAO. 2007. Evaluation of certain food additives and contaminants. *World Health Organ Tech. Rep. Ser.* **1** 1-92.
- Yamano T, Shimizu M, Noda T. 1998. Comparative effects of repeated administration of cadmium on kidney, spleen, thymus, and bone marrow in 2-, 4-, and 8-month-old male Wistar rats. *Toxicol. Sci.* **46** 393-402.



- Yan H, Carter C E, Xu C, Singh P K, Jones M M, Johnson J E, Dietrich M S. 1997. Cadmium-induced apoptosis in the urogenital organs of the male rat and its suppression by chelation. *J. Toxicol. Environ. Health* **52** 149-168.
- Zalups RK, Ahmad S. 2003. Molecular handling of cadmium in transporting epithelia. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **186** 163-188.
- Zang Y, Odwin-Dacosta S, Yager J D. 2009. Effects of cadmium on estrogen receptor mediated signaling and estrogen induced DNA synthesis in T47D human breast cancer cells. *Toxicol. Lett.* **184** 134-138.
- Zeng X, Jin T, Jiang X, Kong Q, Ye T, Nordberg G F. 2004. Effects on the prostate of environmental cadmium exposure--a cross-sectional population study in China. *Biometals* **17** 559-565.
- Zhukalin M, Blanksma M K, Silva T D, Suyehira S W, Harvey W A, Heggland S J, Craig P R. 2007. Characterization and in vitro cytotoxicity testing of ethanolamine-derived cadmium chelating agents. *Biometals* **20** 61-72.
- Zimmerhackl LB, Momm F, Wiegele G, Brandis M. 1998. Cadmium is more toxic to LLC-PK1 cells than to MDCK cells acting on the cadherin-catenin complex. *Am. J. Physiol* **275** F143-F153.